



HAL
open science

Identification de pathogènes parodontaux viraux associés à la maladie d'Alzheimer

Samy Jebnoun

► **To cite this version:**

Samy Jebnoun. Identification de pathogènes parodontaux viraux associés à la maladie d'Alzheimer. Médecine humaine et pathologie. 2024. dumas-04679828

HAL Id: dumas-04679828

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04679828v1>

Submitted on 28 Aug 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ COTE D'AZUR
FACULTÉ DE CHIRURGIE DENTAIRE
5, rue du 22^e BCA, 06300 Nice

Identification de pathogènes parodontaux viraux
associés à la maladie d'Alzheimer

Année 2023-2024

Thèse n°42 57 24 20

THÈSE

Présentée et publiquement soutenue devant
la Faculté de Chirurgie Dentaire de Nice
Le 06 mai 2024 Par

Monsieur Samy JEBNOUN

Né(e) le 02/04/1996 à Nice
Pour obtenir le grade de :

DOCTEUR EN CHIRURGIE DENTAIRE (Diplôme d'État)

Examineurs :

Madame le Professeur
Madame le Docteur
Madame le Professeur
Madame le Docteur
Monsieur le Docteur

Laurence Lupi
Leslie Borsa
Clara Joseph
Pauline Chambon
Alain Doglio

Président du jury
Directrice de thèse
Assesseur
Assesseur
Membre invité

CORPS ENSEIGNANT

MAJ : 01/11/23

56ème section : DEVELOPPEMENT, CROISSANCE ET PREVENTION

Sous-section 01 : ODONTOLOGIE PEDIATRIQUE ET ORTHOPEDIE DENTO-FACIALE

Professeur des Universités

Mme CHARAVET Carole
Mme JOSEPH Clara

Maître de Conférences des Universités

Mme AIEM TORT-ALVAREZ Elody
Mme MASUCCI Caterina

Maître de Conférences des Universités Associé

Mme OUEISS Arlette

Chefs de Clinique Assistants

M. ECALLE Corentin
Mme LAMBERTS Johanna

Attachés

M. CAMIA Julien
Mme DEVILLE Clara
M. OROSCO Philippe

Sous-section 02 : PREVENTION, ÉPIDÉMIOLOGIE, ÉCONOMIE DE LA SANTÉ, ODONTOLOGIE LEGALE

Professeur des Universités

Mme LUPI Laurence

Maître de Conférences des Universités

Mme BORSA Leslie
Mme MERIGO Elisabetta

Chefs de Clinique Assistants

Mme PETTITI Marine

Attachés

M. BARBRY Ludovic
M. GLACHANT Didier
M. TOLILA Gérard

57ème section : CHIRURGIE ORALE ; PARODONTOLOGIE ; BIOLOGIE ORALE

Sous-section 01 : CHIRURGIE ORALE ; PARODONTOLOGIE ; BIOLOGIE ORALE

Professeur des Universités

Mme DRIDI Sophie Myriam
Mme PRECHEUR-SABLAYROLLES Isabelle
Mme VINCENT-BUGNAS Séverine

Maître de Conférences des Universités

M. COCHAIS Patrice
Mme RAYBAUD Héliène
Mme VOHA Christine

Chefs de Clinique Assistants

M. AMELINE Clément
M. BONNICI Quentin
Mme DEMES Estelle
M. GAUDARD Mathias
Mme GUILLOU Estelle

Attachés

M. GEMMI Thomas
M. GUIGON Michael
M. NACACHE Stéphane

58ème section : REHABILITATION ORALE

Sous-section 01 : DENTISTERIE RESTAURATRICE, ENDODONTIE, PROTHESES, FONCTION-DYSFONCTION, IMAGERIE, BIOMATERIAUX

Professeur des Universités

Mme BERTRAND Marie-France
Mme BRULAT-BOUCHARD Nathalie
Mme EHRMANN Elodie
Mme LASSAUZAY Claire

Professeur des Universités Associé

M. DOUGHAN Bassel

Professeur des Universités Emérite

M. ROCCA Jean-Paul

Maître de Conférences des Universités

M. CEINOS Romain
M. LAPLANCHE Olivier
M. LEFORESTIER Eric
M. MAILLE Gérard
Mme POUYSSEJUR-ROUGIER Valérie

Chefs de Clinique Assistants

Mme BERNABEU Marie
Mme BONNES Anais
M. CEPPO Franck
Mme CHAMBON Pauline
Mme DUBOIS Margaux
M. GIRODENGU Alexandre
Mme TEISSEIRE Lise

Attachés

M. ATTAL Bruno
M. PICOT Robin
M. PONCHET Yves
M. WAREMBOURG Philippe

REMERCIEMENTS

A Madame le Professeur Laurence Lupi

Docteur en Chirurgie Dentaire Professeur des Universités -Praticien Hospitalier Sous-section 56-02 : Développement Croissance et Prévention - Discipline Prévention, Epidémiologie, Economie de la santé et Odontologie légale

Merci de m'avoir fait l'honneur d'avoir présidé ce Jury de thèse. Votre immense bienveillance ainsi votre implication dans votre rôle de doyenne de cette faculté m'ont beaucoup touché tout au long de mes études. Veuillez trouver ici le témoignage de mes sincères remerciements et de ma sympathie

A Madame le Docteur Leslie BORSA

Docteur en Chirurgie Dentaire Maître de conférences des Universités Associé Sous-section 56-02 : Développement Croissance et Prévention -Discipline Prévention, Epidémiologie, Economie de la santé et Odontologie légale

Je vous remercie infiniment d'avoir accepté et pris le temps de diriger cette thèse. Mes innombrables bons moments à Cimiez au cours de ma 6^{ème} année d'étude m'ont tout naturellement fait venir vers vous pour le choix de mon sujet de thèse qui laisse une grande empreinte dans la vie d'un praticien. Ce travail de recherche m'a ardemment passionné en me faisant découvrir les joies des manipulations de laboratoires et m'a permis de découvrir des personnes formidables au sein du laboratoire Micoralis. Votre bonne humeur m'a marqué tout au long de mon année de travail et je vous serai éternellement reconnaissant pour ce passage de ma vie.

A Madame le Professeur Clara Joseph

Docteur en Chirurgie Dentaire Professeur des Universités – Praticien Hospitalier Sous-section 56.01 : Développement Croissance et Prévention – Discipline Odontologie pédiatrique et Orthopédie dento-faciale

Merci d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse. Les bons moments en pédodontie passés à vos côtés et l'afterwork post vacation partagé avec vous et votre mari m'ont laissé un très bon souvenir lors de ma 6^{ème} année. Les futurs étudiants qui vous auront en tant que Professeur auront beaucoup de chance et je ne doute pas que vous emmènerez avec vous le soleil au sein de votre nouveau lieu de travail.

A Madame le Pauline Chambon

Docteur en Chirurgie Dentaire Assistante Hospitalo-Universitaire

Je te remercie beaucoup de ta participation au jury. Nous avons commencé nos études ensemble et le fait que tu sois présente aujourd'hui me permet de finir avec un petit morceau de ma promotion initiale. Tu es une formidable assistante encensée par toutes les promotions étudiantes, continues de transmettre ton métier avec autant de bonne humeur et de passion durant ton assistanat.

A Monsieur le Docteur Alain DOGLIO

Docteur en Sciences biologiques et fondamentales appliquées Directeur du Laboratoire de Recherche de Biologie Orale - Micoralis

Je vous remercie infiniment d'avoir accepté mon invitation en tant que membre invité. Grâce à ce sujet de travail j'ai pu faire la découverte de ce magnifique laboratoire qu'est Micoralis et de toute son équipe qui restera pour moi des rencontres formidables.

A ma mère Patricia,

Je te remercie infiniment pour tous tes sacrifices, ton soutien et ton amour indéfectible depuis toujours. Ce travail est aujourd'hui aussi ta récompense car sans toi j'aurais sûrement abandonné mes études de PACES cette après-midi d'été ou j'ai craqué. Tu es la meilleure mère qu'un fils aurait souhaité avoir. Encore merci ma confidente en chef et ma maman, je t'aime.

A mon frère Naïm et ma sœur Anna-Nour,

Merci à vous pour tous ces bons moments partagés depuis toujours. Vous êtes la meilleure fratrie que je puisse avoir et je vous souhaite d'être toujours autant soudés que depuis notre enfance.

A mon père Farhat,

Je te suis éternellement reconnaissant pour tout ton soutien et tes sacrifices. Tu fais beaucoup d'effort au quotidien et je suis fier de toi. Je n'oublierai jamais cette matinée du 10 avril 2024, je t'aime.

A Amandine,

Je te remercie infiniment pour ton amour si pur, la gentillesse et la douceur dont tu baignes mon quotidien depuis 2 ans. Je suis touché par ton soutien sans faille même quand je suis si difficile à supporter. Je suis fier de partager ma vie à tes côtés, puisse cela ne jamais s'arrêter. Je t'aime.

A mon mentor Julian,

Je te suis éternellement reconnaissant de m'avoir ouvert les portes de ton cabinet pour ce stage actif de 6^{ème} année. Tu m'as transmis la passion du métier et la volonté d'exceller dans ce domaine, cela a complètement transcendé ma vision de la dentisterie et j'espère être à la hauteur de tous ce que tu m'as appris.

A l'ensemble de ma famille et mes amis,

Je vous remercie pour tous les bons moments que l'on a vécus ensemble et encore plus pour ceux à venir. Je suis éternellement reconnaissant de vous avoir dans ma vie.

TABLE DES MATIERES

Liste des figures, tableaux et annexes	7
Liste des abréviations.....	8
Introduction.....	10
1 Santé orale, microbiologie parodontale et maladie d'Alzheimer	12
1.1 Lien entre la santé orale et la santé générale	12
1.2 Maladie d'Alzheimer.....	13
1.2.1 Définition	13
1.2.2 Prévalence et coût de la pathologie	13
1.2.3 Facteur de risques.....	14
1.2.4 Diagnostic	14
1.2.5 Traitement	15
1.2.6 Mécanismes neuropathologiques de la maladie d'Alzheimer	15
1.2.6.1 Les plaques amyloïdes.....	15
1.2.6.2 Hyperphosphorylation de la protéine Tau	16
1.3 Maladies parodontales.....	16
1.3.1 Définition	16
1.3.2 Facteur de risque	17
1.3.3 Les parodontites	18
1.4 Maladie d'Alzheimer et flore parodontale bactérienne	18
1.4.1 La flore parodontale	18
1.4.2 Le biofilm parodontal.....	19
1.5 Maladie d'Alzheimer et Herpès virus oraux	20
1.5.1 Classification des Herpès virus oraux	20
1.5.2 Mode d'action des Herpès virus.....	21
1.5.3 Herpès virus et maladie parodontale	21
1.5.4 Herpès virus et maladie d'Alzheimer	22
2 Revue systématique de la littérature : Analyse du lien entre maladies parodontales et Herpès Virus parodontaux.....	23
2.1 Matériel et méthodes	23
2.1.1 Objectifs et identification de la question de recherche	23
2.1.2 Critères d'éligibilité.....	24
2.1.3 Sources d'information et stratégie de recherche	24
2.1.4 Méthodologie de sélection des études	25
2.1.5 Processus de collecte des données.....	25
2.1.6 Evaluation du risque de biais.....	25
2.2 Résultats	26
2.2.1 Sélection des études	26
2.2.2 Caractéristiques des études.....	27
2.2.3 Qualité des études incluses.....	29
2.2.4 Résultats individuels	30
2.3 Discussion	31

2.4	Conclusion	32
3	Etude Clinique.....	32
3.1	Description de la recherche et présentation de son apport	32
3.2	Protocole	33
3.2.1	Design de l'étude.....	33
3.2.2	Considérations éthiques, enregistrement de l'étude et autorisations	34
3.2.3	Objectifs primaire et secondaires	34
3.2.4	Lieux de recrutement et population cible	35
3.2.5	Chronologie de l'étude après diagnostic de la maladie d'Alzheimer	36
3.2.5.1	Visite odontologique	36
3.2.5.2	Types d'échantillons prélevés	36
3.2.6	Etapas de traitement des échantillons.....	37
3.2.6.1	Protocole d'utilisation de la centrifugeuse Storvall ST 8R pour la centrifugation des prélèvements sanguins	37
3.2.6.2	Analyse des prélèvements parodontaux.....	38
3.2.6.2.1	Extraction et purification de l'ADN bactérien et viral	38
3.2.7	PCR quantitative (qPCR)	39
3.3	Résultats	43
4.	Conclusion et perspectives	48
5	Bibliographie.....	67

Liste des figures, tableaux et annexes

Liste des figures

Figure 1: Lien entre la santé orale et la santé générale	12
Figure 2: Les différents stades de la maladie d'Alzheimer	13
Figure 3: Prévalence de la maladie d'Alzheimer en fonction des catégories d'âges	14
Figure 4 : Le parodonte	17
Figure 5: Critères des stades et des grades de la classification des parodontites.....	18
Figure 6 : Les différents complexes bactériens	19
Figure 7: Déroutement d'une infection par herpes virus ⁵⁴	20
Figure 8 : Diagramme PRISMA.....	26
Figure 9 : NIH quality assessment of case-control studies : Y, yes; N, no; NA, not applicable; and NR not reported	29
Figure 10 : Technologie BIOMARK™ HD system, Fluidigm.....	40
Figure 11 : Puce commercialisée par Biomark et utilisée dans cette étude, avec schématisation de la mise en place des primers et des cibles dans les puits.....	41
Figure 12 : Résultats pour la bactérie <i>Aa</i>	43
Figure 13 : Résultats pour la bactérie <i>Pg</i>	43
Figure 14 : Résultats s pour la bactérie <i>An</i>	43
Figure 15 : Résultats pour la bactérie <i>Fn</i>	44
Figure 16 : Résultats pour la bactérie <i>Cp</i>	44
Figure 17 : Résultats pour la bactérie <i>Pe</i>	44
Figure 18 : Résultats pour la bactérie <i>Pi</i>	45
Figure 19 : Résultats pour la bactérie <i>Sg</i>	45
Figure 20 : Résultats pour la bactérie <i>Ssput</i>	45
Figure 21 : Résultats pour la bactérie <i>So</i>	46
Figure 22: Résultats pour le virus HHV7.....	46
Figure 23 : Résultats pour le virus HHV8	46

Liste des tableaux

Tableau 1 : Données extraites des études incluses.....	28
Tableau 2 : Résultats des études incluses	30
Tableau 3 : Tableau des dilutions	42

Liste des annexes

Annexe 1 : Note d'information et formulaire de consentement.....	49
Annexe 2 : CRF (Case report form).....	52
Annexe 3 : Tableau des résultats	66

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

CIM : Classification Internationale des maladies

CRF : Case report form

DSM-V: Diagnostic and statistical manual of mental disorder

NMDA : N-méthyl-D-aspartate

MA : Maladie d'Alzheimer

MCI : Mild cognitive impairment

OMS : Organisation mondiale de la santé

PCR : Réaction en chaîne par polymérase

HHV-1/HSV-1: Virus herpès simplex type 1

HHV-2 : Herpès simplex virus de type 2

HHV-3/VZV : Virus de la varicelle ou du zona

HHV-4/EBV : Epstein Barr virus

HHV-5/CMV : Cytomégalovirus

HHV-6 : Herpès virus humain type 6

HHV-7: Herpès virus humain type 7

HHV-8/KSHV : Herpès virus associé au sarcome de Kaposi

Aa: Aggregatibacter actinomycetemcomitans

Am: Actinomyces massiliensis

An: Actinomyces naeslundii

Cg: Capnocytophaga gingivalis

Cm: Corynebacterium matruchotii

Cp: Centipeda periodontii

Cr: Campylobacter rectus

Dp: Dialister pneumosintes

Ec: Eikenella corrodens

En: Eubacterium nodatum

Fa: Filifactor alocis

Fn: Fusobacterium nucleatum

Ga : Granulicatella adiacens

Gh : Gemella haemolysans

Hp : Haemophilus parainfluenzae

Kp : Klebsiella pneumoniae

Ml : Micrococcus luteus
Mm : Megasphaera micronuciformis
P aeru : Peptostreptococcus anaerobius
P ana: Peptostreptococcus anaerobius
P mel: Prevotella melaninogenica
P micra : Parvimonas micra
Pd : Prevotella denticola
Pe: Porphyromonas endodontalis
Pg: Porphyromonas gingivalis
Pi: Prevotella intermedia
Pn: Prevotella nigrescens
Pp: Propionibacterium propionicum
Rm: Rothia mucilaginosa
S sal: Streptococcus salivarius
S sang: Streptococcus sanguinis
Ssput Selenomonas sputigena
Sg: Streptococcus gordonii
Sm: Streptococcus mutans
So: Streptococcus oralis
Td: Treponema denticola
Tf: Tannerella forsythia
Vp: Veillonella parvula

Introduction

La maladie d'Alzheimer affecte presque 50 millions de personnes dans le monde dont 1 million de français¹. Elle est la première cause de trouble neurocognitif de la population adulte mondiale et est devenue un enjeu de santé publique majeur du fait du vieillissement global de la population et des problèmes sociaux et économiques qu'elle engendre².

En dépit d'une meilleure compréhension des mécanismes neuropathologiques de cette maladie tels le rôle de la protéine Tau ou des peptides Béta-amyloïdes³, les facteurs de risques environnementaux, génétiques, liés à l'âge ainsi que l'étiopathogénie restent toujours abstraits⁴. Un nouvel axe d'étude associe la MA à la santé orale et plus particulièrement aux maladies parodontales. La santé orale est très souvent corrélée à la santé générale. De nombreuses pathologies comme le diabète, les maladies cardio-vasculaires, respiratoires et certains cancers seraient liés à une mauvaise santé bucco-dentaire⁵.

De récentes études semblent montrer un lien significatif entre MA et maladies parodontales⁶. Les maladies parodontales regroupant les parodontites et les gingivites sont des maladies inflammatoires polymicrobiennes touchant les tissus de soutien de la dent. Un déséquilibre des espèces bactériennes (bactéries anaérobies comme *Porphyromonas gingivalis*) et virales (virus appartenant au groupe des Herpès virus Humains) au sein du parodonte (dysbiose) serait une cause de cette pathologie dont la prévalence est très importante au sein de la population mondiale et augmente avec l'âge.

La MA possédant une forte composante inflammatoire cérébrale, tout comme les maladies parodontales, suggérant une diffusion d'agents viraux, microbiens, ou inflammatoires depuis la cavité orale vers le cerveau⁷.

L'inflammation cérébrale provoquée par l'activation des processus immunitaires cérébraux est une cause majeure de l'évolution de la MA. L'interaction entre cette inflammation et la formation des plaques beta-amyloïdes provoque le développement des protéines Tau qui engendrent les lésions neuronales⁸.

Les herpès virus du groupe humain ainsi que certaines bactéries parodontopathogènes seraient des déclencheurs de cette inflammation selon certaines études⁹. En effet leur présence dans les lésions cérébrales de patients décédés atteints de la MA a été démontré dans de récents travaux¹⁰.

Cette infiltration des agents pathogènes dans le système nerveux pourrait avoir lieu soit par voie oro-nasale soit par le biais d'un certain type de cellules inflammatoires : les leucocytes circulants¹¹. Cette perturbation de l'équilibre microbiologique oral chez les malades d'Alzheimer

atteints de maladie parodontale pourrait aggraver l'inflammation au sein des tissus lésionnels cérébraux.

Le principal objectif de cette thèse, conduite dans le cadre de l'étude ORAMICAL, est de tester un nouvel outil de PCR microfluidique, la technologie Biomark, afin de peut-être pouvoir identifier des pathogènes parodontaux viraux du groupe des Herpès virus humains qui seraient significativement associés à la MA, ce qui permettrait d'apporter un outil supplémentaire pour aider tant les professionnels de la santé bucco-dentaire que les gériatres et les neurologues dans la prévention, le suivi ou le traitement de la MA qui représente et représentera dans les années à venir pour nous dentistes une part croissante de notre patientèle.

Afin de vérifier les données scientifiques existantes préalablement à la mise en œuvre du protocole de l'étude et au test de la technologie PCR microfluidique, nous avons réalisé une revue de la littérature sur le sujet. Nous ciblerons de préférence une population adulte avec la moyenne d'âge la plus élevée possible en raison du manque de ressources associant cette problématique à la MA.

1 Santé orale, microbiologie parodontale et maladie d'Alzheimer

1.1 Lien entre la santé orale et la santé générale

Il existe une relation synergique entre de nombreuses pathologies systémiques comme le diabète, des maladies cardio-vasculaires, pulmonaires et une mauvaise santé¹² (Figure 1). Cela est rendu possible par le passage de certaines bactéries ainsi que leurs toxines par voie sanguine lors de la mastication, des brossages dentaires ainsi que de certains soins, on appelle ce phénomène la bactériémie¹³. En présence d'une maladie parodontale et d'un contexte inflammatoire, les tissus mous lésés servent de porte d'entrée pour de nombreux agents pathogènes créant des foyers infectieux ectopiques ainsi que des cytokines inflammatoires. L'inflammation systémique qui en résulte aggrave donc certains foyers inflammatoires déjà présent ou participe à leur genèse¹⁴.

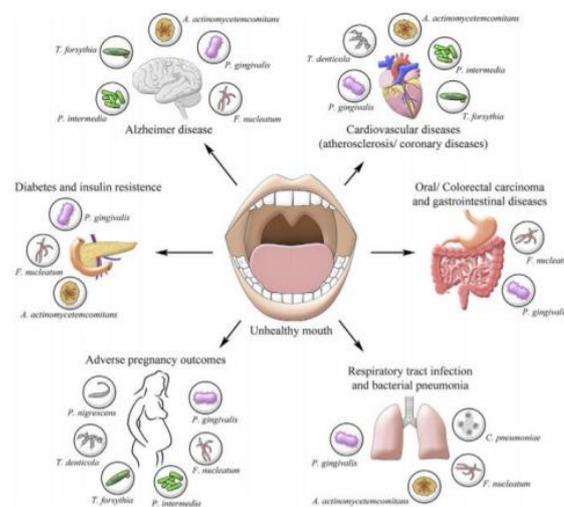


Figure 1: Lien entre la santé orale et la santé générale

La bactérie *Porphyromonas gingivalis* et ses lipopolysaccharides en traversant la barrière hémato-encéphalique¹⁵ et en dupant le système immunitaire ont été retrouvés dans le cerveau et le liquide cébrospinal de patients décédés de la MA¹⁶.

Certains herpès virus humains comme le HSV-1 ainsi que le VZV ont été cités dans plusieurs études comme étant impliqué dans le développement de la MA¹⁷. Des travaux plus récents s'intéressent à l'implication d'HHV-6 et d'HHV-7 car ils ont été retrouvés post-mortem dans le cerveau de patients atteints par la MA¹⁸. La santé orale pourrait ainsi aussi influencer la progression de la MA¹⁹.

1.2 Maladie d'Alzheimer

1.2.1 Définition

La MA est une pathologie neurodégénérative qui évolue lentement. Elle se caractérise par une atrophie et des pertes neuronales débutant dans la région de l'hippocampe au sein du cerveau⁷. Au départ asymptomatique avec une phase pré-clinique assez longue (sauf pour les formes très précoces) et qui ne peut être diagnostiquée qu'à l'aide de techniques d'imagerie médicale et de la biologie²⁰, elle évolue ensuite vers une forme prodromale, pré-démentielle qualifiée de Mild cognitive impairment (MCI) avec des signes cliniques pouvant passer inaperçus. Le stade avéré de la MA se caractérise par une importante déficience cognitive. La maladie est classée en 3 stades : faible ; modérée ; sévère²¹:

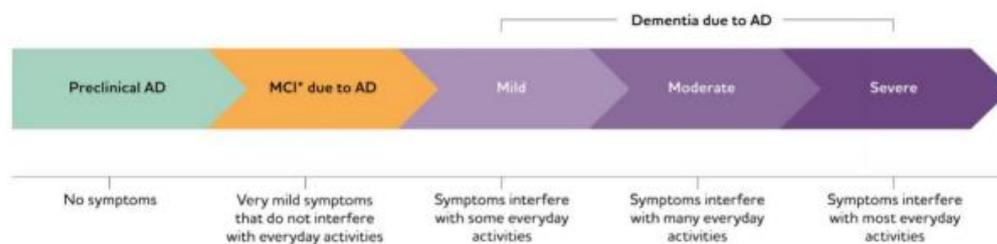


Figure 2: Les différents stades de la maladie d'Alzheimer

La MA existe sous 2 formes différentes. Une première forme déterminée génétiquement affectant des patients de moins de 65 ans. On la nomme de manière fréquente la « maladie d'Alzheimer jeune ». Notre étude ne s'intéresse pas à cette première forme déterminée génétiquement car nous avons pour objectif de relier la pathologie à des facteurs de risques buccaux dentaires. La deuxième forme est multifactorielle et n'est pas déterminée génétiquement. Elle touche des patients plus âgés, avec une moyenne d'âge de 65 ans ou plus. C'est la forme la plus courante, qui regroupe environ 95 % des cas²².

1.2.2 Prévalence et coût de la pathologie

La MA est la première cause de trouble neurocognitif dans la population adulte. L'OMS a déclaré qu'elle représentait la forme la plus fréquente de démence²³. Le coût annuel estimé dans le monde a dépassé 1000 milliards de dollars US²⁴, et le handicap associé a été estimé comme le plus important par rapport à toutes les autres pathologies²⁵.

1.2.3 Facteur de risques

L'origine de la MA reste encore à ce jour très mal connue². La recherche des facteurs de risques est donc devenue cruciale afin d'essayer de comprendre, prévenir, ralentir le développement de la maladie.

Premièrement, l'âge est l'un des facteurs de risque les plus importants⁴. Plus l'âge augmente, plus le risque de développer la MA augmente (figure 3). La moyenne d'âge des personnes atteintes de la MA est de 65 ans ou plus⁵.

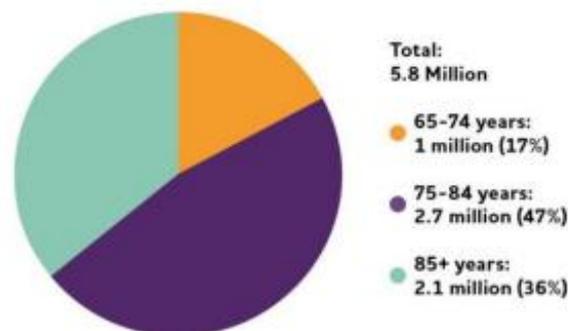


Figure 3: Prévalence de la maladie d'Alzheimer en fonction des catégories d'âges

Les femmes sont plus atteintes de la MA que les hommes²⁶. Par ailleurs, la présence de l'allèle $\epsilon 4$ au locus de l'apolipoprotéine E (ApoE) sur le chromosome 19 est un facteur de risque de la MA²². L'environnement joue un rôle clé dans la forme multifactorielle de la maladie qui est associée à de nombreux facteurs de risques environnementaux modifiables. Pouvoir reconnaître ces facteurs de risques permet de prévenir et, ou de retarder l'apparition de cette pathologie²⁷. Un faible niveau d'éducation, un manque d'exercice physique, la présence de facteurs de risques cardiovasculaires, des antécédents de traumatismes cérébraux, des facteurs de risques liés à la nutrition, l'immunité, la fonction mitochondriale ainsi que les infections sont associées à une plus forte probabilité de développer la MA².

1.2.4 Diagnostic

Le diagnostic de la maladie fait suite aux symptômes cliniques dont souffrent les patients¹ qui viennent généralement consulter suite à une dégradation de leur qualité de vie. Le diagnostic doit d'abord exclure d'autres pathologies telles que la démence à corps de Lewy diffus, la démence fronto-temporale ou également la présence de tumeurs cérébrales²⁸.

Des outils diagnostic comportementaux et cognitifs permettent de différencier et de classer les différents troubles mentaux afin de mieux les diagnostiquer²⁸. On peut citer parmi ceux-ci

le DSM-V (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition)²⁹ qui correspond au test de référence, respectivement les CIM-10³⁰ et CIM-11³¹ qui correspondent à la Classification internationale des Maladies, 10^{ème} et 11^{ème} révision et le NINCDS-ADRDA³² pour (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association). Les tests cognitifs, fonctionnels et comportementaux sont complétés d'un bilan sanguin et de tests par biomarqueurs (ponction lombaire ou imagerie cérébrale), suivant le cas, pour conforter le diagnostic de MA².

1.2.5 Traitement

A l'heure actuelle aucun traitement qui permet de ralentir la progression de la MA ou d'en guérir. Les traitements actuels permettent seulement d'atténuer les symptômes en agissant sur la quantité de neurotransmetteurs dans le cerveau via leur augmentation¹. Actuellement on retrouve cinq molécules actives sur le marché pouvant être prescrite par un médecin gériatre, un neurologue ou un psychiatre : le Donépézil, la Rivastigmine et la Galantamine agissent comme des inhibiteurs de de la cholinestérase. Un agoniste des récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA) appelé la Memantine peut être utilisée en association avec le Donépézil. Elle est recommandée chez les patients atteints de démence modérée à sévère avec des troubles de l'attention. Associé aux traitements médicamenteux, la stimulation cognitive, les thérapies cognitives et musicales permettent de diminuer l'apparition des troubles neuropsychiatriques et du comportement³³. Les démences engendrent un coût énorme à l'échelle mondiale, on estime que d'ici 2030 les dépenses engendrées par leur prise en charge représenteront le PIB des Pays-Bas ou de l'Arabie Saoudite, soit 2 billions de dollars américains²⁶. Le Lécanémab (Leqembi) est autorisé aux États-Unis pour traiter les formes débutantes de la MA. Ce nouveau traitement est en cours d'examen en Europe où il suscite de grands espoirs, compte tenu du manque dramatique de thérapie contre les démences. Chez les patients qui sont à un stade précoce de la maladie, le traitement a permis de réduire de 35% le déclin cognitif et fonctionnel. 26000 dollars/an.³⁴

1.2.6 Mécanismes neuropathologiques de la maladie d'Alzheimer

Le processus de dégénérescence neuronale causant la MA est lié à la présence de deux composants cérébraux : les plaques amyloïdes et la protéine Tau hyperphosphorylée³⁵.

1.2.6.1 Les plaques amyloïdes

Les plaques amyloïdes sont produites lors du clivage de de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP)³⁶, glycoprotéine transmembranaire présente dans les neurones. Chez le

sujet sain, elle va être clivée majoritairement par la protéase α pour former le peptide circulant sAAP- α dont la présence est extracellulaire. Le fragment sAAP α ainsi que le fragment restant de la protéine APP sont solubles et facilement dégradables³⁷.

Chez les patients atteints par la MA, c'est la protéase- β intervient dans le clivage de la protéine APP. Le fragment issu du clivage est un peptide A β de forme insoluble et très stable. Les peptides A β s'accumulent alors en extra-cellulaire et forment des agrégats nommés plaques amyloïdes qui vont perturber le bon fonctionnement neural³⁶. L'accumulation de ces plaques va être à l'origine d'une pénétration plus importante du calcium dans les neurones entraînant une réaction inflammatoire puis la mort de la cellule.

1.2.6.2 Hyperphosphorylation de la protéine Tau

La protéine Tau fait partie des composants du cytosquelette de la cellule²². Lorsqu'elle s'associe avec les microtubules, elle permet de maintenir leur organisation et leur polymérisation. Les enchevêtrements neurofibrillaires retrouvés dans la MA correspondent à une accumulation de la protéine Tau hyperphosphorylée. Une hyperphosphorylation de la protéine Tau est provoquée par l'augmentation anormale intracellulaire du calcium causé par l'accumulation extra-cellulaire de peptides A β qui se détachent des microtubules et forment des filaments hélicoïdaux nommés neurofibrilles. Ce processus va modifier la polymérisation du cytosquelette et entraîner la mort du neurone².

1.3 Maladies parodontales

1.3.1 Définition

Le parodonte est un ensemble de structures qui assurent la fixation et le soutien des dents sur les maxillaires, on le qualifie de « tissu de soutien des dents »³⁸. Il constitue un premier rempart contre la pénétration des différents micro-organismes au sein des tissus sous-jacents³⁹. On distingue le parodonte profond qui comprend l'os alvéolaire, le desmodonte et le cément ; du parodonte superficiel constitué par la gencive libre et attachée (figure 4).

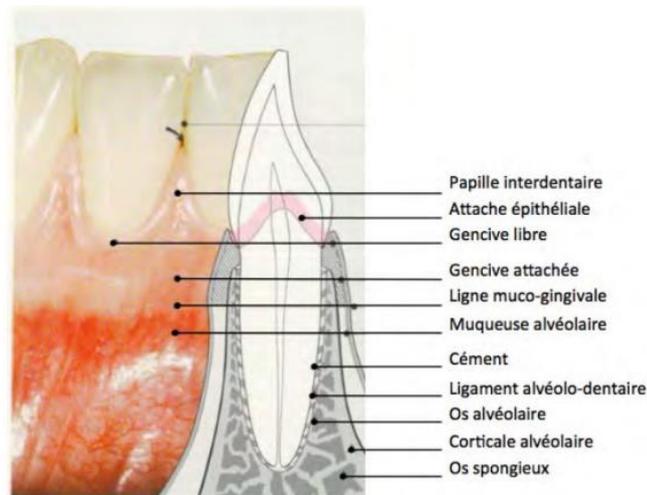


Figure 4 : Le parodonte

Les maladies parodontales sont des maladies inflammatoires et polymicrobiennes qui touchent les tissus profonds et superficiels du parodonte⁴⁰. Au stade initial, lorsque le processus inflammatoire ne touche que la gencive c'est une gingivite. Lorsque celle-ci persiste et progresse, elle atteint les tissus profonds qui comportent l'os alvéolaire, le cément et le ligament. Cette progression correspond au stade de la parodontite qui se caractérise par la formation de poches parodontales autour des dents, de résorptions alvéolaires et l'apparition de récessions gingivales entraînant de nombreux problèmes de mobilités, de sensibilités et facilitant le passage d'agents infectieux viraux et bactériens¹².

1.3.2 Facteur de risque

Les facteurs de risque sont des variables et modifient l'incidence, la sévérité, la gravité des atteintes pathologiques auxquelles ils sont associés. Ils peuvent être locaux ou généraux, modifiables ou non, issus de l'environnement ou acquis génétiquement. Dans le cas des maladies parodontales on peut retrouver des facteurs de risque locaux, tels que les encombrements, les malpositions dentaires ou les restaurations iatrogènes qui peuvent exercer une influence sur les manœuvres d'hygiène, en favorisant l'accumulation du biofilm, ou bien, avoir un impact sur la réponse immunitaire et la cicatrisation de l'hôte⁴¹.

De nombreuses études ont mis en évidence de nombreuses associations avec des facteurs de risques généraux tels l'âge et le sexe⁴², l'ethnie⁴³, les habitudes de vie tel le tabagisme, la consommation d'alcool ou le stress⁴⁴, le diabète⁴⁵, les facteurs hormonaux tels l'ostéoporose, les carences en calcium et vitamines et les facteurs génétiques⁴⁶.

1.3.3 Les parodontites

La classification de Chicago⁴⁷ décrit trois types de parodontites : les parodontites nécrotiques, les parodontites comme expression d'une maladie systémique et les parodontites induite par la plaque uniquement. Ces dernières regroupent les parodontites agressives et les parodontites chroniques qui se distinguent par leur stade et leur grade⁴⁷ (Figure 5).

STADES : SEVERITE - COMPLEXITE

		Stade 1	Stade 2	Stade 3	Stade 4
Sévérité	→ Perte d'attache interdentaire*	1 à 2 mm	3 à 4 mm / non	≥ 5 mm	≥ 5 mm
	→ Alvéolyse radiographique	< 15%	15 à 33%	≥ 50%	≥ 50%
	→ Dents absentes pour raisons parodontales	0	0	≥ 4	≥ 5
Complexité	→ Profondeur de poche	≤ 4 mm	≤ 5 mm	≥ 6 mm	≥ 6 mm
	→ Alvéolyse radiographique	Horizontale essentiellement	Horizontale essentiellement	Verticale ≥ 3 mm	Verticale ≥ 3 mm
	→ Lésions inter-radicaulaires	Non ou classe I	Non ou classe I	Classes II ou III	Classes II ou III
	→ Défaut crestal	Non ou léger	Non ou léger	Modéré	Sévère
Étendue	→ Besoin en réhabilitation complexe**	Non	Non	Non	Oui
	→ Elle est considérée comme localisée lorsqu'elle touche < 30% des dents et généralisée si elle touche > 30% des dents				

GRADES : RAPIDITÉ DE PROGRESSION

	Taux de progression	Grade A - Faible	Grade B - Modéré	Grade C - Rapide
Critères	→ Perte d'attache ou alvéolyse radiographique sur les 5 dernières années	Non	< 2 mm	≥ 2 mm
	→ Ratio pourcentage d'alvéolyse/âge*	< 0,25	0,25 à 1	> 1
	→ Ratio quantité de plaque/destruction parodontale***	Importante / faible	Normal	Faible / Importante
Facteurs modifiants	→ Consommation quotidienne de cigarettes	Non	< 10	≥ 10
	→ Diabètes	Non	Oui HbA1c < 7,0%	Oui HbA1c ≥ 7,0%

*au site le plus atteint. **à moduler en fonction de dysfonction masticatoire, de trauma occlusal secondaire (mobilité ≥ 2), d'effondrement occlusal, de moins de 20 dents résiduelles (10 paires antagonistes)... ***attention à certaines formes spécifiques avec atteinte des molaires/incisives

Figure 5: Critères des stades et des grades de la classification des parodontites

1.4 Maladie d'Alzheimer et flore parodontale bactérienne

1.4.1 La flore parodontale

Il existe dans la cavité orale environ 700 espèces différentes de microorganismes qui vivent en symbiose, dont la moitié sont non cultivables en laboratoire⁶. Cette flore n'est pas fixe, des modifications peuvent s'opérer à la suite de changements au sein de l'environnement buccal et de l'organisme des patients⁴⁸. Le risque est que certains agents pathogènes présent normalement en infériorité se multiplient et deviennent prédominants : cela conduit à une dysbiose. La maladie parodontale débute alors suite à une réponse immunitaire mis en place par l'organisme du patient pour se défendre⁴⁹. La flore parodontopathogène est principalement composée de bactéries à gram négatif et anaérobies. Les plus couramment retrouvées sont : *Prevotella intermedia* (Pi), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Fusobacterium nucleatum* (Fn), *Treponema denticola* (Td) et *Treponema forsythia* (Tf)⁵⁰.

L'étude de Socransky et al.⁵¹ a permis de mettre en évidence les différents complexes bactériens et leur effets cliniques.

A l'état sain, on retrouve principalement dans le biofilm les bactéries des complexes bleu, jaune, violet et vert. Dans le cas de maladies parodontales, les bactéries du complexe rouge, *Tf*, *Pg*, et *Td* et du complexe orange augmentent⁵¹. Le complexe rouge, le plus délétère, est associé aux parodontites sévères, à une augmentation de la profondeur des poches parodontales ainsi qu'à un saignement au sondage (Figure 6).

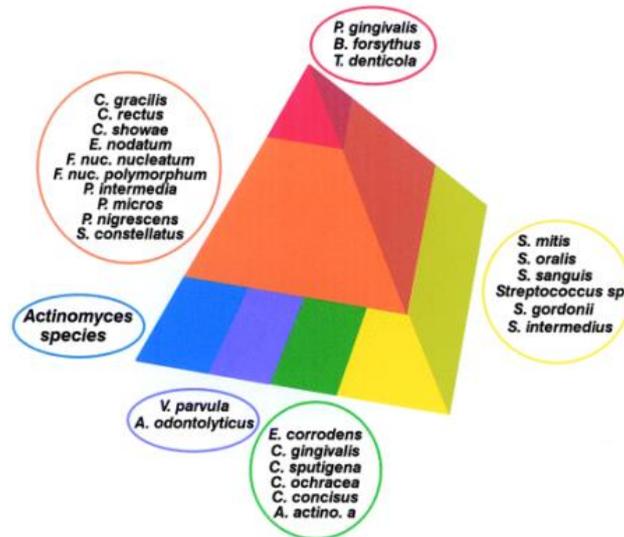


Figure 6 : Les différents complexes bactériens

1.4.2 Le biofilm parodontal

Un biofilm correspond à une organisation de micro-organismes au sein d'une matrice composée de protéines, d'acides nucléiques et de polysaccharides extracellulaires, pouvant coloniser tous les environnements. Les biofilms se forment en effet spontanément sur les surfaces ; ils sont donc omniprésents dans notre environnement⁵².

La croissance du biofilm bactérien est organisée, avec des étapes d'association, d'adhérence puis de multiplication et de maturation. Sur des colonisateurs primaires qui dans le cas des maladies parodontales seront principalement des streptocoques du complexes jaunes, les actinomyces du complexe bleu ainsi que les bactéries du complexe violet et vert vont adhérer des colonisateurs secondaires marquant l'étape de coagrégation. L'étude du microbiote a donc permis de mettre en évidence les différents rôles des bactéries constituant le biofilm. Certains micro-organismes ont la capacité d'orchestrer la dysbiose permettant l'invasion et la propagation de l'infection⁴⁸. Ils agissent principalement dans l'intérêt d'autres espèces présentes afin d'engendrer une destruction massive⁵³. On qualifie ces micro-organismes de « clés de voûte ». C'est le cas de *Pg* dans le cadre du biofilm parodontopathogène. Elle a la

capacité de pénétrer et de détruire les tissus ainsi que de désactiver les défenses immunitaires de l'hôte¹⁹

1.5 Maladie d'Alzheimer et Herpès virus oraux

1.5.1 Classification des Herpès virus oraux

Il existe une centaine d'herpès virus (HHV) plus ou moins décrits. L'Homme peut être infecté par seulement huit virus appartenant à cette grande famille :

- HHV1 : Herpès simplex virus de type 1, HSV-1
- HHV2 : Herpès simplex virus de type 2, HSV-2
- HHV3 : Virus de la varicelle ou du zona, VZV
- HHV4 : Epstein Barr virus, EBV
- HHV5 : Cytomégalovirus, CMV
- HHV6 : Herpès virus humain 6A et 6B, HHV6A et HHV6B
- HHV7 : Herpès virus humain 7, HHV7
- HHV8 : Herpès virus associé au sarcome de Kaposi, KSHV

Ces huit HHV sont classés dans la famille des Herpesviridae et répartis en trois sous-familles :

- Alpha herpesvirus/Alphaherpesvirinae : Ils sont caractérisés par un cycle reproductif extrêmement rapide de seulement quelques heures, une destruction rapide de la cellule infectée et une capacité à se répliquer dans une large variété de tissus de l'hôte et comprenant HSV-1 et HSV-2 et le VZV.
- Beta herpesvirus ou Betaherpesvirinae : Ils sont caractérisés par un cycle de multiplication long de 15 jours, avec une infection progressant lentement dans les cellules et comprenant CMV, HHV-6 et HHV-7.
- Gamma herpesvirus ou Gammaherpesvirinae : Ils ont un nombre très limité de cibles cellulaires et comprenant EBV et HHV-8.

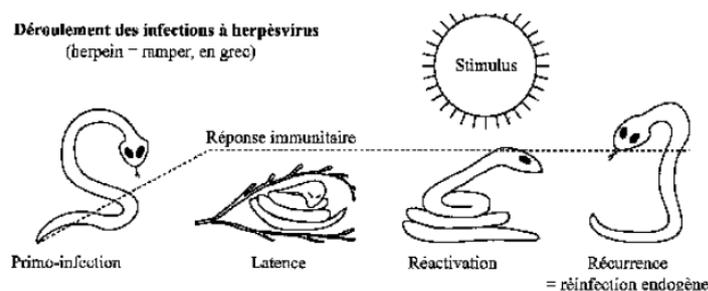


Figure 7: Déroulement d'une infection par herpès virus⁵⁴

1.5.2 Mode d'action des Herpès virus

Ce sont des virus à ADN qui comportent des génomes de grande taille :120 à 130 kilo paires de bases. Ils contiennent un nombre élevé de gènes capables de produire une centaine de protéines au cours du cycle réplcatif. Leur transmission interhumaine nécessite généralement des contacts étroits par transmission de fluides corporels dus à la présence de leur enveloppe labile. Après l'infection initiale, ces virus restent quiescents dans les cellules hôtes spécifiques et peuvent ultérieurement se réactiver. Les syndromes cliniques dus à la primo-infection peuvent être très différents de ceux provoqués par leur réactivation. Malgré le fait qu'ils soient génétiquement et structurellement similaires, ils provoquent un large panel de syndromes cliniques généralement non chevauchants.

La réplication de l'ADN viral est très différente de celle de l'ADN cellulaire car elle exige la présence d'une ADN polymérase d'origine virale.⁵⁵ La caractéristique essentielle des infections aux différents herpès virus est de persister à vie dans l'organisme après la phase de primo-infection. Le virus reste dans une forme de stase mais il conserve la capacité d'être activé à tout moment pour provoquer des symptômes cliniques. La phase de quiescence désignée comme une "infection latente" permet au virus d'échapper au système immunitaire étant donné qu'il n'exprime quasiment aucun antigène. A ce stade seul le génome viral ADN se maintient dans la cellule infectée de façon autonome, notamment au cours des mitoses de la cellule hôte. Pour des raisons variées comme la fatigue, le stress, l'inflammation le virus peut se réactiver rapidement via l'accomplissement d'un cycle viral complet et productions de nouveaux virons donnant alors une réinfection endogène : on appelle ce phénomène une récurrence. Les récurrences sont l'occasion d'une excrétion virale, souvent asymptomatique, assurant l'infection de nouveaux hôtes.

1.5.3 Herpès virus et maladie parodontale

La pathogénie des maladies parodontales est considérée comme un processus à plusieurs étapes impliquant des interactions complexes entre HHV, bactéries, facteurs de l'hôte et facteurs environnementaux modulateurs de la maladie⁵⁶. Les HHV sont connus pour augmenter la gravité de la maladie chez les patients parodontaux⁵⁷. Des études concernant principalement HSV-1, EBV, CMV et HHV-7, ont montré une association significative entre ces derniers et les maladies parodontales⁵⁸.

Parmi les facteurs de risque des gingivites non induites par la plaque on peut citer des virus tels que HSV-1, VZV, EBV, HPV qui provoquent tous les symptômes couramment retrouvés dans cette affection gingivale : inflammation, rougeurs, œdèmes et saignement⁵⁹. On retrouve

les virus HSV-1 et EBV dans les tissus parodontaux de patients atteints de parodontite chronique⁶⁰. Les virus EBV, HSV-1, HHV-6 et CMV seraient associés à la gingivite ulcéro-nécrotique et VZV pourrait contribuer à une nécrose du parodonte et de l'os mandibulaire.

Une méta-analyse⁶¹ a pu montrer qu'une fréquence élevée de détection d'EBV est associée à un risque accru de parodontite. L'association entre la co-infection herpétique/bactérienne et les maladies parodontales ont aussi été décrites, comme pour *Pg* et CMV ou Aa et HSV-1. Cependant, la manière dont les interactions entre les herpès virus et les bactéries parodontales influencent l'inflammation parodontale n'est toujours pas claire.

1.5.4 Herpès virus et maladie d'Alzheimer

A ce jour, de nombreux travaux commencent à établir un lien solide entre la MA et les infections herpétiques⁶². Les herpès virus, notamment le HSV-1, ainsi que le VZV¹⁷, ont été cités comme impliqués dans le développement de la MA, bien que ces relations restent controversées.

Chen et al.⁶³ et Bae et al.⁶⁴ ont constaté que le zona était associé à un risque clair mais faible de MA et de démence, et à un risque significativement plus faible chez les personnes traitées par des antiviraux. Il a en effet été suggéré par des études récentes que le traitement antiviral de type acyclovir ou valacyclovir serait associé à une diminution ultérieure de l'incidence de la MA chez les personnes infectées par l'herpès, ayant ainsi un effet protecteur⁶⁵. Le traitement antiviral a aussi été associé à un risque réduit de démence à long terme chez les personnes présentant des signes manifestes d'infection herpétique⁶⁴. Cette constatation est conforme aux résultats antérieurs indiquant que les herpès virus sont impliqués dans la pathogenèse de la MA. Cependant, ces observations ne permettent pas d'établir une relation de cause à effet entre l'herpès virus, le traitement antiviral et la démence.

De même, la question de l'effet de la vaccination contre le virus HZ reste débattue. Selon les résultats d'une première étude sur le sujet, la vaccination contre le virus HZ a ainsi été retrouvée associée à un risque réduit de démence⁶⁶. Une seconde étude a évalué la relation entre la vaccination contre le virus HZ et les troubles cognitifs. Les résultats mettent également en évidence que la vaccination contre le virus HZ réduit le risque de démence⁶⁷.

Un nombre croissant d'études plutôt solides associent HSV-1 avec un risque majeur de présence de MA^{87,88}. D'autres études récentes s'intéressent à la possible implication du HHV-6 dans la MA⁶⁸. En effet, une augmentation de la quantité de HSV-1 et HHV-6A/7 a été observée dans le cerveau de patients décédés et atteints de MA¹⁸.

Une autre étude a pu montrer que, chez les patients atteints de MA, la fréquence de HHV-6 était élevée (70 %) tandis qu'elle était plus faible chez les témoins non atteints par la MA (40 %). Elle a aussi mis en évidence que HHV-6 et HSV-1 étaient retrouvés dans 54 % des cerveaux des patients atteints de MA. Cependant, HSV-1 a aussi été retrouvé dans le cerveau

d'une forte proportion de témoins âgés infectés mais asymptomatiques⁶⁹. La plupart des patients atteints de la MA, contre très peu de témoins âgés, étaient porteurs de l'allèle APOE-ε4, la présence du HSV-1 dans le cerveau et l'APOE-ε4 ont ainsi été proposés comme un facteur de risque majeur de la MA⁷⁰. Le HHV-6 n'est pas directement associé aux patients atteints de la MA et porteurs de l'APOE-ε4, il pourrait plutôt renforcer les dommages causés par le HSV-1 et l'APOE-ε4 dans la MA⁷¹.

Même si le sujet est soumis à controverses, de plus en plus de preuves tendent ainsi vers une association entre HHV et MA. La cavité buccale héberge de nombreuses espèces virales neurotropes, dont on connaît pour certaines l'implication dans les maladies parodontales. A l'heure actuelle la recherche s'est peu penchée sur la sphère orale, or l'hypothèse d'une incursion cérébrale par des voies périphériques est souvent avancée.

2 Revue systématique de la littérature : Analyse du lien entre maladies parodontales et Herpès Virus parodontaux

2.1 Matériel et méthodes

2.1.1 Objectifs et identification de la question de recherche

Nous avons procédé à une analyse systématique de la littérature scientifique et rapporté les résultats conformément aux directives PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses)⁷² L'étude a été enregistrée dans PROSPERO, sous le numéro CRD42024529149.

L'objectif principal de cette étude était d'analyser le lien entre la présence d'un ou plusieurs HHV dans la plaque sous-gingivale/le liquide crévulaire et la gingivite/la parodontite chez les patients adultes.

Les questions de recherche en lien avec les objectifs de recherche étaient les suivantes : « Existe-t-il un lien entre détection de HHV parodontaux et maladies parodontales ? », et, dans l'affirmative, « Quels HHV parodontaux sont les plus détectés dans les maladies parodontales ? »

La revue s'est construite autour de la méthode PECOS (Population, Exposition, Comparison, Outcome and Study) :

- Exposition : Présence d'une maladie parodontale (gingivite ou parodontite)
- Contrôles (Comparison) : Absence d'une maladie parodontale (gingivite ou parodontite)

- Résultats (Outcome) : HHV détecté(s) dans la plaque sous-gingivale ou le liquide crévicaire par une technique de PCR
- Etude (Study) : Etudes observationnelles de type cas-contrôle

La question PICO était ainsi la suivante : " Les adultes (P) atteints de maladie parodontale (E), comparés à ceux qui n'en sont pas atteints (C), présentent-ils plus de taux de HHV dans la plaque sous-gingivale ou le liquide crévicaire (O) ?"

2.1.2 Critères d'éligibilité

Les conditions d'éligibilité ont été précisées avant le début de la revue.

Les critères de d'inclusion étaient les suivants :

- Articles publiés entre 2000 et mars 2024 avec un résumé disponible
- Etudes rédigées en anglais
- Etudes incluant des patients adultes âgés de 20 ans ou plus
- Etudes cliniques, études longitudinales (cas-contrôles ; rétrospectives et/ou prospectives), observationnelles objectivant un lien entre maladie parodontale et HHV
- Etudes comportant un prélèvement de plaque sous-gingivale ou de liquide crévicaire
- Etude utilisant une technique d'identification de HHV par PCR

Les critères d'exclusion étaient les suivants :

- Etudes incluant des patients âgés de moins de 20 ans
- Etudes comportant uniquement un prélèvement salivaire
- Etudes dont les maladies parodontales sont mal définies/ avec des paramètres cliniques insuffisants

Etudes non comparatives, études in vitro, études expérimentales sur modèle animal, études narratives, éditoriaux, avis d'auteur, études menées sur des bases de données ou des questionnaires, revues narratives, revues systématiques et meta analyses.

2.1.3 Sources d'information et stratégie de recherche

Une recherche informatisée a été réalisée pour la dernière fois le 27 mars 2024 sur les bases de données suivantes : PubMed (MEDLINE), Scopus, Cochrane (Cochrane Library) et Embase afin d'identifier les études publiées éligibles. Une recherche manuelle a également

été réalisée dans la bibliographie de chaque article inclus, afin d'identifier de possibles articles n'ayant pas été trouvés via la recherche électronique.

Les mots-clés utilisés étaient “periodontal disease”, “periodontitis”, “periodontal pocket”, “herpes virus”, “herpes viruses”, “viral”, “Herpes Simplex virus”, “Epstein Barr virus” and “Cytomegalovirus”.

Les mots-clés ont été mélangés à l'aide d'opérateurs booléens et des termes MeSH (pour MEDLINE et Cochrane) ou Emtree (pour Embase) ont été utilisés en fonction de la base de données.

Par exemple, la stratégie de recherche utilisée pour la base de données PubMed (MEDLINE) était : ('periodontal pocket' OR 'periodontal disease' (MeSH) OR 'periodontitis'(MeSH)) AND ('viral' OR 'herpes virus' OR 'herpes viruses' OR 'herpes simplex virus'(MeSH) OR 'cytomegalovirus' (MeSH) OR 'Epstein Barr virus' (MeSH)).

2.1.4 Méthodologie de sélection des études

Pour estimer leur éligibilité, l'évaluation des articles sélectionnés a été effectuée après suppression des duplicatas à l'intérieur des bases de données et entre les bases de données à l'aide d'un logiciel de gestion de bibliographie (Zotero version 6.0.36).

Deux auteurs ont extrait les données de manière indépendante. Les articles intéressants ont ainsi été sélectionnés sur la base de leurs titres et de leurs résumés.

La sélection finale des articles à inclure était basée sur la lecture des textes intégraux, en fonction des caractéristiques du PICO, ainsi que des critères d'inclusion et d'exclusion. Les raisons de l'exclusion ont été documentées à chaque étape. Toute divergence concernant les références, les critères de sélection des sujets, les caractéristiques des échantillons, les critères de diagnostic des MP et la classification des sujets, les résultats et les données pertinentes et les résultats a été résolue par une discussion entre les auteurs.

2.1.5 Processus de collecte des données

Pour chaque étude éligible, les données suivantes ont été extraites par deux membres de l'équipe de recherche : nom du premier auteur, année de publication, pays, type d'étude, description du protocole, critères d'inclusion et d'exclusion des patients, âge des participants, nombre total d'inclusions par étude, comparaison et résultats.

L'analyse des articles a été qualitative et descriptive.

2.1.6 Evaluation du risque de biais

L'évaluation du risque de biais a été réalisée indépendamment par deux examinateurs.

Les outils d'évaluation de la qualité des études des National Institutes of Health (NIH) pour les études observationnelles de cohortes et les études transversales en plus de ceux des études cas-témoins ont été utilisés pour évaluer la qualité de chaque étude éligible⁷³. En cas de divergence, un consensus a été atteint après discussion et réévaluation entre deux membres de l'équipe de recherche et, si nécessaire, l'avis d'un troisième membre de l'équipe de revue a été demandé.

2.2 Résultats

2.2.1 Sélection des études

La stratégie de recherche a initialement révélé 2409 articles sur quatre bases de données. 364 doublons ont été éliminés électroniquement dont : 7 doublons intrabase pour la base Scopus, et 3 doublons intrabase pour les bases de données Embase et Pubmed .1995 sur 2045 articles restants ont été éliminés sur la base de leur titre. Les 50 articles restants ont été évalués sur leur résumé, en accord avec les critères d'éligibilité définis au préalable. Des évaluations supplémentaires ont été réalisées sur 22 articles complets, parmi eux, 6 articles ont finalement été inclus dans l'analyse qualitative (Figure 8).

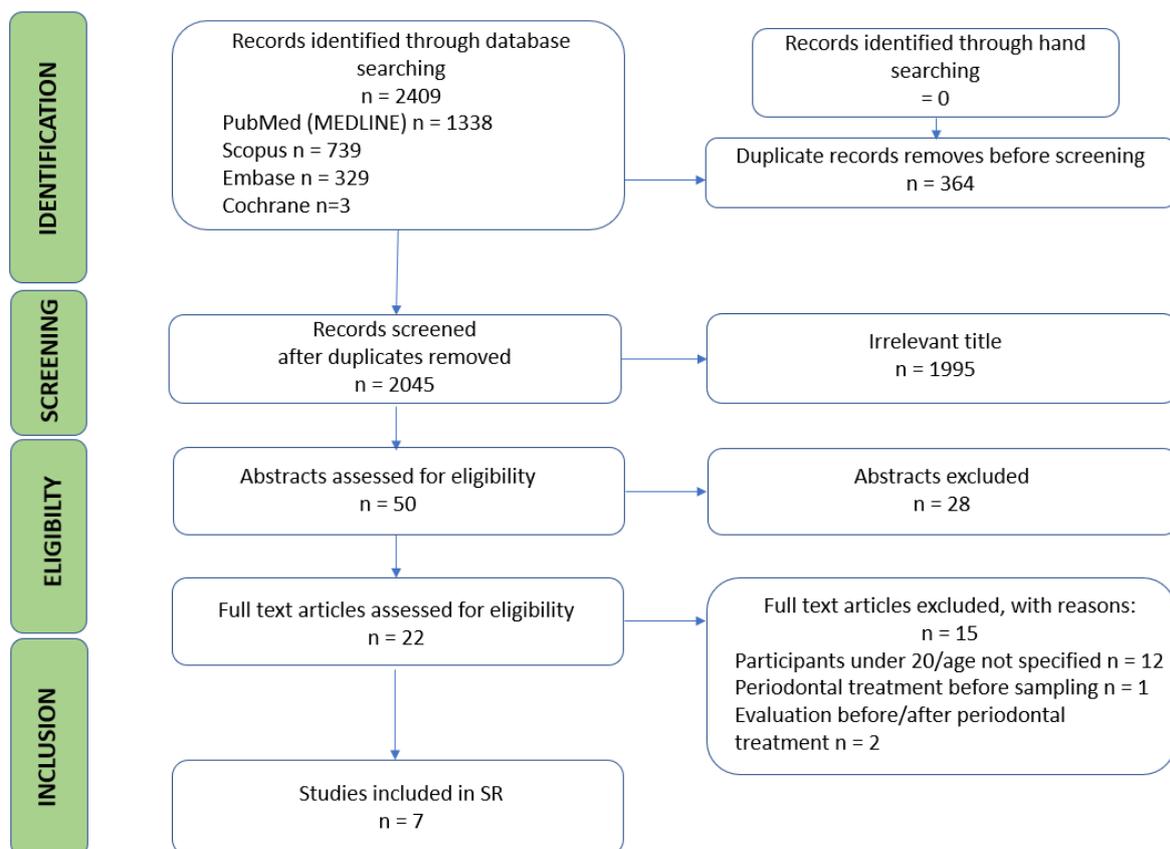


Figure 8 : Diagramme PRISMA

2.2.2 Caractéristiques des études

Le tableau 1 décrit les caractéristiques de chaque étude. Les sept études analysées étaient des études longitudinales de type cas-contrôle. Deux études ont été conduites en Turquie^{74,75}, une en Allemagne⁷⁶, une en Iran⁷⁷, une aux Etats-Unis d'Amérique⁷⁸, une au Portugal⁷⁹ et une en Inde⁸⁰. Un total de 476 patients a été inclus, dont 223 contrôles, 251 atteints de parodontite et 2 atteints de gingivite. Les adultes inclus avaient des âges compris entre 21 ans et 70 ans. Les diagnostics parodontaux utilisés variaient selon les études, dépendant de l'année de parution, 3 d'entre elles ont utilisé la Classification d'Armitage⁴⁷ et 1 utilisaient la Classification de Chicago⁴⁷ alors que 3 ne faisaient référence à aucune classification pour le diagnostic des maladies parodontales. Les cibles microbiologiques étaient : HSV-1 ciblé par 5 études, HSV-2 ciblé par 4 études, HCMV ciblé par 5 études, HHV-6 ciblé par une étude, HHV-7 ciblé par une étude, HHV-8 ciblé par une étude, *Pg* ciblé par une étude, *Tf* ciblé par une étude, *Pi* ciblé par une étude, *Aa* ciblé par une étude, *Fn* ciblé par une étude, *Cr* ciblé par une étude. EBV a été ciblé dans toutes les études incluses (EBV-1 dans 3 études et EBV-2 dans une étude). Trois études avaient recours à un prélèvement avec curette et 4 d'entre elles à un prélèvement par buvardage, avant extraction d'ADN et mise en œuvre de la technique de PCR.

Tableau 1 : Données extraites des études incluses (Np, non précisé)

AUTEUR/ DATE/ JOURNAL	PAYS	TYPE D'ETUDE	AVIS ETHIQUE/ CONSENTEMENT	AGE DES PARTICIPANTS	CRITERES INCLUSION/EXCLUSION	NOMBRE D'INCLUSIONS
Stein et al., 2013 J Clin Periodontol	Allemagne	cas-témoin	Le protocole de l'étude a été approuvé par le comité d'éthique de l'Université d'Aachen et le consentement éclairé écrit de tous les sujets a été obtenu avant les examens.	Ages : 23-70 ans avec: -Parodontite aggressive: 35.4 ± 5.9 ans -Contrôles sains: 40.0 ± 10.3 ans et âge ≥30 ans	Inclusion : sujets atteints de parodontite (CAL≥3,5 mm) après examen parodontal. Exclusion : (i) ascendance non caucasienne, (ii) présence de maladies systémiques, (iii) prise d'antibiotiques systémiques au cours des 3 derniers mois, (iv) utilisation d'un dispositif de rinçage antimicrobien oral au cours des 3 derniers mois, (v) hyperplasie gingivale induite par des médicaments, (vi) utilisation chronique de médicaments anti-inflammatoires ou (vii) grossesse en cours, (viii) moins de 20 dents.	130 adultes: -65 patients avec parodontite aggressive -65 contrôles sains
Contreras et al., 2000 Oral Microbiol Immunol	USA, California	cas-témoin	NON	Age moyen: 50 ans (24-68 ans)	NP	25 adultes: (8 hommes et 17 femmes) -2 avec gingivite -2 avec parodontite légère -13 avec parodontite -1 avec parodontite juvénile post-localisée -7 contrôles sains
Saygun et al., 2002 J Periodontol	Turquie	cas-témoin	Le protocole a été approuvé par le comité d'éthique de l'Académie médicale militaire de Gülhane, Sciences dentaires, Ankara, Turquie. Le consentement éclairé de tous les sujets a été obtenu et toutes les procédures ont été entièrement expliquées avant l'étude.	30 avec parodontite chronique (35-52 ans), age moyen 42.8 21 contrôles sains (35-47 ans), age moyen 41.72	Inclusion : Participants en bonne santé systémique et n'ayant pas reçu de traitement parodontal ou d'antibiotiques pendant au moins 6 mois avant l'étude.	51 adultes: (26 hommes et 25 femmes) -30 avec parodontite chronique -21 contrôles sains
Moghim et al., 2007 Pak. J. Biol. Sci	Iran	cas-témoin	NON	61 avec parodontite (24-69 ans), age moyen 43 40 contrôles sains (21-69 ans), age moyen 41.35	Inclusion : Participants en bonne santé systémique et n'ayant pas reçu de traitement parodontal ou d'antibiotiques pendant au moins 6 mois avant l'échantillonnage.	101 adultes: (45 hommes et 56 femmes) -61 avec parodontite -40 contrôles sains
Saygun et al., 2008 J Periodont Res	Turquie	cas-témoin	Le comité d'éthique et d'examen interne de l'Académie médicale militaire de Gülhane, Sciences dentaires, a approuvé l'étude. Un consentement éclairé écrit a été obtenu pour chaque sujet de l'étude après que toutes les procédures aient été entièrement expliquées.	6 avec parodontite chronique (32-49 ans) 15 contrôles sains (31-42 ans)	Inclusion : Participants en bonne santé systémique et n'ayant pas reçu de traitement parodontal ou d'antibiotiques pendant au moins 6 mois avant le début de l'étude.	30 adultes, dont 21 inclus dans notre revue: -9 avec parodontite agressive (non inclus) -6 avec parodontite chronique -15 contrôles sains
Piccolo et al., 2023 Eur J Dent	Portugal	cas-témoin	Cette étude a été approuvée par le comité d'éthique des sujets humains de la Cooperativa de Ensino Superior Egas Moniz, CRL. Tous les sujets ont donné leur consentement éclairé par écrit.	Groupe 26-45 ans : 39 contrôles sains et 22 avec parodontite Groupe 246 ans : 11 contrôles sains et 26 avec parodontite	Exclusion : apparition d'une infection virale au cours des 6 mois avant l'étude clinique, exposition à des médicaments antiviraux dans les 6 mois précédant l'enquête, antécédents cliniques d'immunosuppression, exogène ou endogène, et chimiothérapie dans les 6 mois précédents	100 adultes (46 hommes et 54 femmes), dont 98 inclus dans notre revue: -2 patients avec âge 18-25: 2 avec parodontite (non inclus) -61 patients avec âge 26-45 ans: 22 avec parodontite et 39 contrôles sains -37 patients avec âge ≥46 ans : 26 avec parodontite et 11 contrôles sains
Das et al., 2012 Journal of Oral and Maxillofacial Pathology	Inde	cas-témoin	L'étude a été réalisée après avoir obtenu l'autorisation éthique du comité d'examen institutionnel du département ambulatoire de parodontie, College of Dental Sciences, Davanpura Karnataka Inde	25 contrôles sains 21-45 ans 25 avec parodontite chronique ≥35 ans	Inclusion : Patients en bonne santé systémique et n'ayant pas reçu d'antibiotiques ou de thérapie parodontale au cours des 6 mois précédant l'échantillonnage et l'enregistrement. Exclusion : Fumeurs, femmes enceintes et mères allaitantes.	75 adultes, dont 50 inclus dans notre revue : 25 avec parodontite agressive (non inclus) 25 avec parodontite chronique 25 contrôles sains

2.2.3 Qualité des études incluses

En ce qui concerne les biais, la qualité des études incluses a été évaluée selon les critères des outils d'évaluation de la qualité des études du NIH pour les études cas-témoins. Sur la base de ces critères, 6 études ont été qualifiées de bonne qualité^{74,75,77-79}, tandis que 1 études⁷⁶ a été jugée de qualité moyenne. Les outils d'évaluation de la qualité pour chaque étude sélectionnée sont présentés dans la figure 9.

NIH Quality assessment Case/Control studies	Research question	Study population	Sample justification	Cases and controls from same/similar population	Process to identify participants	Definition cases and controls	Cases and controls randomly selected from those eligible	Use of current controls	Risk occurred prior to the condition that defined a case	Definition and validation of the measures f risk	Blinded assessors	Key potential confounding variables statistically measured
Stein et al., 2013 J Clin Periodontol	Y	Y	N	Y	Y	Y	NA	Y	NR	Y	NR	N
Contreras et al., 2000 Oral Microbiol Immunol	Y	Y	N	Y	Y	Y	NA	Y	NR	Y	NR	Y
Saygun et al., 2002 J Periodontol	Y	Y	N	Y	Y	Y	NA	Y	NR	Y	NR	Y
Moghim et al., 2007 Pak. J. Biol. Sci	Y	Y	N	Y	Y	Y	NA	Y	NR	Y	NR	Y
Saygun et al., 2008 J Periodont Res	Y	Y	N	Y	Y	Y	NA	Y	NR	Y	NR	Y
Piccolo et al., 2023 Eur J Dent	Y	Y	Y	Y	Y	Y	NA	Y	Y	Y	NR	Y
Das et al., 2012 Journal of Oral and Maxillofacial Pathology	Y	Y	N	NR	Y	Y	NA	Y	NR	Y	NR	Y

Figure 9 : NIH quality assessment of case-control studies : Y, yes; N, no; NA, not applicable; and NR not reported

2.2.4 Résultats individuels

Le tableau 2 décrit les résultats de chaque étude. 6 études sur les 7 incluses ont ainsi démontré une différence dans la détection des HHV ciblés entre le groupe cas et le groupe contrôle.

Tableau 2 : Résultats des études incluses (Np, non précisé)

AUTEUR/ DATE/ JOURNAL	PARAMETRES CLINIQUES	DIAGNOSTIC PARODONTAL	CIBLES MICROBIOLOGIQUES	TYPE DE PRELEVEMENT	ANALYSE MICROBIOLOGIQUE	COMPARAISON/RESULTATS/ TESTS STATISTIQUES
Stein et al., 2013 J Clin Periodontol	PD, CAL, PI, GI, BoP	Armitage 1999	HCMV, HSV-1, EBV	Echantillons de plaque sous-gingivale, prélevés dans la poche la plus profonde de chaque quadrant de l'arcade à l'aide d'une pointe de papier stérile.	Extraction d'ADN et RT-PCR ont été utilisés pour détecter l'ADN viral de HCMV, HSV-1 et EBV.	Les données de l'étude ne suggèrent aucune contribution de HSV-1, EBV ou HCMV à la parodontite agressive dans une population allemande.
Contreras et al., 2000 Oral Microbiol Immunol	NP	Armitage 1999	HSV, EBV-1, EBV-2, HCMV, HHV-6, HHV-7, HHV-8	Échantillon de poche parodontale prélevé à l'aide de pointes de papier stériles (et échantillon de biopsie gingivale).	Extraction d'ADN et nested PCR ont été utilisés pour détecter l'ADN viral de HSV, de EBV-1, EBV-2, HCMV, HHV-6, HHV-7 et HHV-8.	Dans les sites parodontaux sains, HCMV a été détecté dans 1 (9%) et EBV-1 dans 2 (18%) échantillons de poches. Dans les lésions de parodontite, HCMV a été détecté dans 9 (64%) échantillons de poches et EBV-1 a été détecté dans 6 (43%) échantillons de poches.
Saygun et al., 2002 J Periodontol	PI, GI, PD, CAL	NP	HCMV, EBV-1, HSV	Échantillons de plaque sous-gingivale prélevés à l'aide de pointes de papier stérile.	Extraction d'ADN et nested PCR ont été utilisés pour détecter l'ADN viral de HCMV, EBV-1 et HSV.	Les résultats de la présente étude: -Confirment la présence fréquente du HCMV dans les échantillons crévicaux des lésions de parodontite chronique (HCMV détecté chez 44,3 % des patients atteints de parodontite chronique et 14,3 % des personnes saines (p<005.)) -Suggèrent une relation étroite entre la présence du HCMV et de l'EBV1 dans les zones sous-gingivales et les mesures de la profondeur de sondage et de la perte d'attache au sondage (Différences dans les mesures de PI de la dentition entière et de GI de la dentition entière entre les sites où le HSV a été détecté et ceux où il n'a pas été détecté statistiquement significatives)
Moghim et al., 2007 Pak. J. Biol. Sci	PD et CAL pour le diagnostic parodontal	PD et CAL pour le diagnostic parodontal	EBV-1	Prélèvement de plaque avec curette stérile dans une poche parodontale.	Extraction d'ADN et nested PCR ont été utilisés pour détecter l'ADN viral de EBV-1.	EBV-1 détecté dans 37 échantillons de patients atteints de parodontite chronique contre 1 sujet sain. Infection à EBV associée à la maladie parodontale
Saygun et al., 2008 J Periodont Res	PI, GI, BoP, PD et CAL	PI, GI, BoP, PD et CAL pour le diagnostic parodontal	EBV, HCMV and <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Tannerella forsythia</i> , <i>Prevotella intermedia</i> , <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> and <i>Campylobacter rectus</i>	Prélèvement de plaque avec curette stérile dans la poche parodontale la plus profonde.	Extraction d'ADN et RT-PCR (TaqMan) a été utilisée pour détecter l'ADN viral et bactérien de EBV, CMV et de <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Tannerella forsythia</i> , <i>Prevotella intermedia</i> , <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> , <i>Fusobacterium</i>	HCMV détecté dans 8 lésions parodontales et 1 site parodontal sain. EBV détecté dans 9 lésions parodontales et 2 sites parodontaux sains. Corrélation entre CMV et <i>Pg Tj Cr</i> et entre EBV et <i>Pg Tj</i> . Présence de CMV et EBV associée à une perte d'attache, une augmentation de la profondeur de poche et un saignement au sondage
Piccolo et al., 2023 Eur J Dent	PD, hauteur gingivale, degré de mobilité dentaire, perte de dents, CAL, GI, PI	Classification de Chicago 2018 (stades et grades)	HSV-1, HSV-2, EBV, CMV	Des échantillons de liquide crévicaire non stimulé ont été prélevés à l'aide de deux cônes de papier de taille 35 par sujet, placés dans la poche pendant 30 secondes	Extraction d'ADN et PCR multiplex utilisés pour détecter l'ADN viral de HSV-1, HSV-2, EBV et HCMV.	La prévalence des Herpesviridae était de 6 % dans le groupe contrôle et de 60 % dans le groupe parodontite (environ 60 % aux stades II, III et IV de la parodontite). HSV-1 était prévalent à tous les stades et grades de la parodontite. HSV-2, CMV et EBV étaient prévalents dans les stades B et C. EBV avait une prévalence marquée dans le stade C.
Das et al., 2012 Journal of Oral and Maxillofacial Pathology	PI, GI, PD, CAL	Armitage 1999	HSV-1, HSV-2, EBV, HCMV	Subgingival samples were collected by a sterile curette from deepest pocket for chronic periodontitis and from sites with probing depth ≤ 3 for healthy patients	Extraction d'ADN et PCR multiplex utilisés pour détecter l'ADN viral de HSV-1, HSV-2, EBV et HCMV.	HSV-1 a été détecté dans 76 % (p<0,001) des sites présentant une parodontite chronique. Les sites où l'on a détecté le HSV-1 étaient plus en rapport avec les sites où les poches étaient profondes et où la perte d'attache clinique était plus importante; EBV a été détecté dans 32 % (p<0,05) des sites atteints de parodontite chronique. Ces virus pourraient être associés à la sévérité et à la progression de la maladie parodontale destructrice.

2.3 Discussion

Cette revue systématique comprenant 7 études fournit des preuves d'une relation entre HHV et maladies parodontales. Toutefois, ces éléments de preuve pourraient faire l'objet d'un examen plus approfondi.

Deux études^{77,78} n'ont pas fait appel à l'avis d'un comité d'éthique, ce qui pourrait peut-être être expliqué par les dates auxquelles ont été effectuées ces recherches.

Dans les études analysées, toutes ne se basent pas sur une classification éprouvée pour effectuer un diagnostic de maladie parodontale. C'est en effet seulement le cas de 4 études^{76,78-80}. Ainsi, dans Les 3 études restantes, seuls des critères cliniques étaient évoqués^{74,75,77}.

Une étude⁷⁵ a analysé la présence de bactéries parodontopathogènes en plus des HHV. Le choix de considérer aussi les données bactériologiques peut être pertinent puisqu'il est connu que certaines bactéries et/ou certains complexes bactériens sont défavorablement associés à un état de maladie parodontale^{31,32,81}. Six études^{74,74,77-80} ont pu montrer un lien entre détection d'EBV et maladie parodontale. Ceci est en corrélation avec la littérature actuelle.

En effet une méta-analyse⁶¹ s'est penchée plus particulièrement sur la relation entre l'EBV et la parodontite ainsi que les paramètres cliniques dans l'objectif d'établir une clarification, du fait certaines controverses. Même si les études incluses sont hétérogènes, nécessitant une certaine prudence dans l'interprétation des résultats, l'analyse a pu montrer qu'une fréquence élevée de détection de l'EBV est associée à un risque accru de parodontite. CMV fait également partie des HHV ciblés dans les études analysées. Celui-ci a été retrouvé associé à la parodontite dans 4 des 6 études qui s'y sont intéressé. Une étude⁷⁹ a également montré la prévalence de HSV-1 à tous les stades et grades de la parodontite, alors qu'une autre étude⁸⁰ a détecté HSV-1 à tous les stades dans 76 % ($p < 0,001$) des sites présentant une parodontite chronique. CMV et HSV-1 font partie des herpès virus retrouvés associés à la parodontite dans la littérature.

L'association entre la co-infection herpétique/bactérienne et les maladies parodontales ont aussi été décrites, comme pour *Pg* et CMV ou *Aa* et HSV-1. Cependant, la manière dont les interactions entre les herpèsvirus et les bactéries parodontales influencent l'inflammation parodontale n'est toujours pas claire. Une étude in vitro⁸² a ainsi souhaité étudier les effets de la co-infection avec certaines bactéries buccales sur les cellules épithéliales buccales infectées par le HSV-1. Il est apparu que *Aa* a augmenté le rendement du HSV-1. La co-infection peut profiter soit au HSV-1 soit à *Aa*. Ces résultats font écho à des études cliniques antérieures montrant la co-infection du HSV et de *Aa* chez des patients atteints de parodontite agressive. Une autre étude avait pour objectif de clarifier l'association entre le CMV oral et la parodontite⁸³. Des échantillons de rinçage buccal ont été prélevés sur 190 patients afin d'y

examiner la présence de l'ADN du CMV en utilisant la réaction en chaîne par réaction polymérase en temps réel). *Pg* a été détecté par une analyse semi- quantitative par PCR. La co-infection par le CMV et *Pg* était significativement associée à la parodontite active. De plus, l'étude a montré que les interactions entre le CMV et *Pg* peuvent être liées à la sévérité de la maladie parodontale.

Si les études incluses semblent indiquer un lien entre HHV et maladies parodontales, des études incluant un plus grand nombre de participants, ciblant l'ensemble des HHV parodontaux et décrivant un protocole d'inclusion plus rigoureux restent indispensables pour objectiver la force de ce lien.

2.4 Conclusion

Cette revue a permis de conclure à un lien potentiel entre HHV et maladie parodontale. En effet, la grande majorité des études incluses montre une détection significativement plus importante des HHV dans les sites parodontaux atteints vs non atteints, particulièrement concernant HCMV et EBV. Après retravail de l'ensemble de la revue, celle-ci sera soumise pour publication.

3 Etude Clinique

3.1 Description de la recherche et présentation de son apport

Malgré de nombreux progrès réalisés depuis une trentaine d'années sur la compréhension des mécanismes neuropathologiques l'étiopathogénie de la MA reste encore peu comprise voire controversée.

Des preuves toujours plus importantes semblent indiquer un lien entre maladies parodontales et MA, faisant progresser l'hypothèse selon laquelle le microbiote parodontal pourrait jouer un rôle dans la pathogenèse de la maladie. Des études récentes suggèrent que l'inflammation neuronale pourrait avoir une origine infectieuse, or la parodontite est une maladie à composante inflammatoire dont la principale étiologie est infectieuse. Des modifications microbiologiques du biofilm oral (dysbiose) sont responsables de la pathologie. Certains pathogènes parodontaux majeurs ont ainsi été détectés dans les lésions cérébrales de la MA⁷, suggérant une connexion infectieuse entre la sphère oro-pharyngée et le cerveau.

En plus des bactéries parodontopathogènes, de nombreuses études ont suggéré un lien entre parodontite et présence de virus du groupe des herpès virus humains (HHV). Ainsi, des infections par EBV, HSV-1 et le CMV ont été reliées à la présence d'une inflammation de la

cavité orale et au risque de parodontite⁵⁸. De récentes études ont de plus mis en évidence une implication des HHV dans les maladies neurodégénératives dont la MA⁶².

Toutes ces découvertes montrent l'intérêt certain d'améliorer la recherche dans ce domaine. **L'objectif de ma thèse a ainsi été de réaliser sur un nombre réduit d'échantillons de patients atteints et non atteints de MA une détection de pathogènes parodontaux viraux via l'outil BIOMARK™ HD system, PCR en système microfluidique de chez Fluidigm.** Plusieurs réunions préparatoires avec l'équipe du laboratoire, en particulier le Dr Alain DOGLIO (directeur) et Morgane ORTIS (doctorante), ont permis de discuter des objectifs de ce travail et d'en affiner le protocole. **J'ai ainsi pu réaliser sur les patients recrutés l'examen dentaire et les différents prélèvements parodontaux, et j'ai effectué les étapes de traitement des échantillons obtenus.**

3.2 Protocole

3.2.1 Design de l'étude

Ce protocole s'inscrit dans le cadre de l'étude ORAMICAL (Oral Microbiology in Alzheimer's patients), étude monocentrique cas/contrôle, non randomisée et interventionnelle de catégorie 2, qui vise principalement à étudier au niveau parodontal la présence d'une sélection de bactéries parodontopathogènes et d'espèces virales chez des patients diagnostiqués ou non avec la MA. Les marqueurs d'inflammation pouvant être retrouvés dans la circulation sanguine générale seront aussi recherchés dans le plasma récupéré à partir la prise de sang réalisée sur chaque patient.

Cette étude est conduite au CHU de Nice sur des patients âgés de 70 ans et plus atteints (cas) ou non (témoins) de MA.

Ce projet est une recherche impliquant la personne humaine de catégorie 2, il est soumis au dispositif du Code de la Santé Publique (Loi n°2012-300 du 5 Mars 2012) relative au recherche impliquant la personne humaine telle que modifiée par l'ordonnance n°2016-800 du 16 juin 2016.

Ce protocole est en accord avec les lignes directrices SPIRIT qui correspond au Standard Protocol Items : Recommendations for Interventional Trials. Les lignes directrices STROBE (Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology) ont été également suivi.

3.2.2 Considérations éthiques, enregistrement de l'étude et autorisations

Le protocole de l'étude ORAMICAL a été réalisé en accord avec la déclaration d'Helsinki. Le comité éthique de "protection des personnes d'Ile de France V" (CPP de France) a approuvé le protocole le 4 août 2021 (numéro national d'enregistrement 2021-A01501-40). Cette étude a été enregistrée sur ClinicalTrials.gov (numéro d'identification NCT04869904), et auprès de la DRCI en janvier 2022 sous la référence 21-AOI-05 en tant qu'étude interne au CHU de Nice. Ce projet, déposé dans le cadre de l'appel à projets interne 2021 a été retenu par le bureau de la DRCI (Délégation à la Recherche clinique et à l'Innovation) pour un financement à hauteur de 9895 €.

3.2.3 Objectifs primaire et secondaires

Cette étude clinique a pour objectif principal d'établir une cartographie d'un ensemble d'espèces bactériennes et virales parodontales chez des personnes âgées de plus de 70 ans, diagnostiquées ou non avec la MA, afin d'établir une signature microbiologique parodontale précoce et prédictive potentiellement associée à la MA (prélèvements par grattage et buvardage gingival dans les poches parodontales). Cette signature sera établie en associant des marqueurs de type viraux (groupe des Herpes Virus humains HHV très représentatifs de l'état inflammatoire oral et même systémique) et des marqueurs bactériens caractéristiques de la flore orale bactérienne dysbiotique et commensale.

Cette étude implique une technologie innovante de détection des cibles microbiennes et virales par PCR, à savoir la PCR en système microfluidique de type Biomark HD de chez Fluidigm. La caractéristique essentielle de cet outil technologique est de pouvoir quantifier, en simultané, des dizaines de cibles dans des centaines d'échantillons biologiques.

Les objectifs secondaires sont de comparer entre cas et contrôles :

- De comparer l'état bucco-dentaire
- De comparer l'état parodontal
- De comparer le niveau d'hygiène buccale
- De comparer les taux sanguins des marqueurs inflammatoires circulants IL-1 β , IL-6, TNFR1, TNFR2, α 1- ACT, sCD40L, hsCRP, IL-8 and MCP-1

3.2.4 Lieux de recrutement et population cible

Le recrutement des patients de l'étude est réalisé à l'hôpital de Cimiez, CHU de Nice, dans l'annexe du pôle odontologie (Dr Leslie Borsa et Samy Jebnoun) pour les prélèvements parodontaux et le recueil des données orales, et dans le service de consultations gériatriques du pôle RAV (Dr Isabelle Bereder/Dr Guillaume SACCO/Dr Emeline MICHEL) pour le prélèvement sanguin.

L'étude cible une population de patients âgés de 70 ans et plus. Lors du diagnostic de MA, établi par un gériatre selon les critères du DSM-V, il est proposé au patient diagnostiqué ainsi qu'à son conjoint, le cas échéant, de participer à l'étude car dans ce contexte l'environnemental partagé par le cas et le contrôle est identique. Les patients atteints de maladies graves ou pouvant interférer avec les prélèvements (telles une hémopathie grave ou une maladie inflammatoire de type polyarthrite rhumatoïde) ou ceux protégés par la loi sous tutelle ou sous curatelle, ou ne pouvant pas participer à une étude clinique au titre de l'article L. 1121-16 du Code français de Santé Publique ne sont pas inclus dans l'étude. Si le patient et/ou un accompagnant (contrôle) accepte de participer à l'étude, il devra signer un consentement (annexe 1) qui sera recueilli par le chirurgien-dentiste investigateur après un entretien compréhensible par le patient et/ou sa personne de confiance et la délivrance d'une notice d'information écrite. Le formulaire de consentement éclairé sera signé en deux exemplaires par les différentes parties. La date de l'information, la date de signature du consentement par les 2 parties seront stipulées dans le dossier source du patient, dans le CRF et dans le logiciel RedCp.

Le calcul d'échantillon fait état d'un objectif de recrutement de 47 cas et 47 contrôles pour l'ensemble de l'étude. **Mon travail a porté sur 11 patients (6 cas et 5 contrôles), échantillon suffisant pour pouvoir tester la technologie Biomark HD.**

3.2.5 Chronologie de l'étude après diagnostic de la maladie d'Alzheimer

3.2.5.1 Visite odontologique

Le chirurgien-dentiste évalue la situation bucco-dentaire du patient et la nécessité de soins. Un CRF est complété et archivé (Annexe 2), il contient notamment les éléments diagnostic suivants :

- Diagnostic de l'état bucco-dentaire évalué par les paramètres suivants :
 - Prothèses dentaires (présence et niveau d'adaptation),
 - Coefficient masticatoire (en %)
 - Nombre de lésions carieuses évaluées via l'indice CAOD (si présence)
 - Présence des mobilités dentaires et leur graduation effectuée selon la classification de Mühlemann (1951) :
 - Stade de l'atteinte carieuse (si présence) : CAOD

- Diagnostic parodontal : charting parodontal avec codifications (index de plaque, index gingival, profondeur de poches, attachement clinique). Un relevé écrit daté des indices parodontaux en vigueur (CAL, PPS, PI, BOP) appelé charting parodontal sera réalisé.

Un détartrage est proposé aux patients dont l'état bucco-dentaire le nécessite.

3.2.5.2 Types d'échantillons prélevés

Pour chaque patient participant à l'étude trois types de prélèvements biologiques différents sont réalisés. Ils sont stockés dans des tubes étiquetés avec le numéro d'inclusion et les initiales du patient :

- Trois aliquots de 1,5 mL de plasma répartis dans des Eppendorff de 5mL. Ils sont obtenus après centrifugation des prélèvements sanguins réalisés par l'infirmier de jour du pôle RAV (centrifugeuse *Storvall ST 8R*) et sont ensuite stockés à -80°C pour une étude sérologique et une détection des pathogènes ultérieures.

- Du fluide créviculaire gingival prélevé à l'aide de 3 cônes de papier stériles de chaque taille (n°25 et n°30). Les cônes seront plongés dans le sulcus pendant au moins 1 minute afin de collecter un maximum d'ADN.

- Un échantillon de plaque dentaire prélevé à l'aide d'une curette parodontale adaptée à la localisation du site à prélever.

Les prélèvements parodontaux sont déposés dans tubes Eppendorf qui auront été préalablement remplis de 180 microL de buffer ATL sous hotte dans un flux d'air stérile et après nettoyage des surfaces au *Surfanios*, et réalisés au niveau de la dent présentant l'atteinte parodontale la plus sévère. À profondeurs de poches égales dans une même bouche, la dent prélevée sera une 1ère molaire supérieure droite ou à défaut la 1ère molaire supérieure gauche ou à défaut la molaire supérieure droite la plus proche, ou à défaut la molaire supérieure gauche la plus proche ou à défaut la 1ère molaire inférieure droite, ou à défaut la 1ère molaire inférieure gauche ou à défaut la dent la plus proche.

Conformément à la loi informatique et libertés n°2004-801 du 6/08/2004, les inclusions ont été anonymisées avec un code alphanumérique comprenant le numéro du centre d'inclusion, le numéro de l'inclusion et les initiales du patient (par exemple le code du premier patient est 01-001-BE). Les données concernant les patients inclus sont conservées dans un document Microsoft Excel® protégé par mot de passe et partagé uniquement avec les différents investigateurs ainsi que l'Attachée de Recherche Clinique de l'IMBD.

3.2.6 Etapes de traitement des échantillons

3.2.6.1 Protocole d'utilisation de la centrifugeuse Storvall ST 8R pour la centrifugation des prélèvements sanguins

1	Allumer
2	Préchauffage 15 min : vérifier réglages 1200 rpm /15 min / 4°C puis bouton flocon puis start
3	Mettre les tubes en répartissant la charge, re vérifier les réglages puis start
4	Sortir les tubes avec une pince pour ne pas re-mélanger sang et plasma
5	L'investigateur réalise ensuite les trois aliquots de plasma de 1.5 ml dans des Eppendorff de 5ml.

Les prélèvements seront stockés dans un premier temps dans un congélateur à -80 °C au sein du pavillon Mossa. Ils seront ensuite acheminés vers le laboratoire Micoralis (équipe de recherche du Dr A. Doglio UPR7354, Faculté d'Odontologie, Université Côte d'Azur) où ils seront aussi stockés dans un congélateur à -80°C par l'investigateur coordinateur, le Dr L. Borsa avant de réaliser les manipulations inhérentes aux échantillons.

3.2.6.2 Analyse des prélèvements parodontaux

3.2.6.2.1 Extraction et purification de l'ADN bactérien et viral

L'extraction et la purification de l'ADN issu des prélèvements bactériens réalisés en clinique ont été réalisés à l'aide du *Qiagen QuiAmp Mini Kit DNA, Protocole A-B (Gram -)*, selon le protocole ci-dessous :

EXTRACTION DE L'ADN	
1	<ul style="list-style-type: none"> -Préparer le bain marie à 56°C -Décongeler les prélèvements donnant lieu à une analyse microbiologique. -Les soniquer 10 minutes à température ambiante, (Soniqueur Fisher Scientific) : <ol style="list-style-type: none"> 1-Remplir d'eau à moitié puis brancher 2-Mettre les tubes fermés sur une planche en mousse 3-Fermer le bac 4-Allumer et mettre sur 10 min → Pendant l'étape de soniquage commencer à préparer le matériel pour l'étape 2 -Vortexer 15 secondes puis centrifuger brièvement. -Oter les cônes de papier (à l'aide d'une précelle décontaminée à l'éthanol).
2	<ul style="list-style-type: none"> -Ajouter 20 microL de protéinase K, sans mouvement circulaire. -Vortexer 15 secondes. -Incuber 1 heure, à 56°C (au bain marie), en vortexant toutes les 30 minutes pour disperser l'ADN et ainsi augmenter l'efficacité de la protéinase K. -Centrifuger brièvement pour enlever les gouttes présentes à l'intérieur du couvercle.
3	<ul style="list-style-type: none"> -Ajouter 200 microL de Buffer AL. Les échantillons et le buffer AL doivent être complètement mélangés afin que la solution soit homogène. -Pulse-vortexer 15 secondes. -Incuber 10 minutes à 70°C. -Centrifuger brièvement.
4	<ul style="list-style-type: none"> -Ajouter 200 microL d'éthanol (96-100%). -Pulse-vortexer 15 secondes. -Centrifuger brièvement.
PURIFICATION DE L'ADN	
<p>Pour les buffers AW1 et AW2 il faut systématiquement vérifier que l'ajout d'alcool dans les bouteilles a bien été effectué.</p>	
5	<ul style="list-style-type: none"> -Appliquer délicatement la préparation dans la colonne (<i>QIAmp Mini spin column</i>). Fermer le couvercle. Programmer sur 700mL. Vider doucement en tournant sur les parois. Marquer d'un numéro les tubes sur leur couvercle. -Centrifuger 1 minute à 8000 rpm (centrifugeuse <i>Storvall ST8R</i>). <ol style="list-style-type: none"> 1-Allumer 2-Ouvrir couvercle 3-Mettre les tubes à l'opposé (pour la répartition des poids). 4-Régler à 8 pour cette étape. -Placer la colonne dans un nouveau tube de 2 ml et jeter le tube contenant le filtrat.
6	<ul style="list-style-type: none"> -Ajouter 500 microL de Buffer AW1 et fermer le couvercle. -Centrifuger 1 minute à 8000 rpm. -Placer la colonne dans un nouveau tube de 2 ml et jeter le tube contenant le filtrat.
7	<ul style="list-style-type: none"> -Ajouter 500 microL de Buffer AW2 et fermer le couvercle. -Centrifuger 3 minutes à 14000 rpm.
7bis	<ul style="list-style-type: none"> -Transférer dans un collection tube de 2ml chaque échantillon.

	-Centrifuger 2 minutes à 13,2 pour séchage.
ELUTION DE L'ADN	
8	- Placer la colonne dans un tube stérile de 1,5 ml et jeter le tube contenant le filtrat. Ecrire les infos sur les nouveaux tubes. -Ajouter 200 microL de Buffer AE, afin d'éluider l'ADN contenu dans la colonne. -Incuber 5 minutes à température ambiante. -Centrifuger 2 minutes au maximum de RPM. -Conserver les tubes de 1,5 ml.
9	-Réitérer l'étape 8. -Conserver les tubes de 1,5 ml.
ANALYSE DE LA QUANTITE ET DE LA QUALITE DE L'ADN	
10	-Prélever 2 microL de chaque échantillon, après avoir agité le tube. -Les placer au sein du nanodrop spectrophotomètre, préalablement calibré 2 fois par l'analyse réitérée de Buffer AE. Le nanodrop est renseigné des caractéristiques suivantes : Version : 4585 V3 0.1 Pathlength : 0,5 mm Dilution Factor : 1.000 Background : On Factor : 50.0 Units : ng/ul Il analyse la quantité et la qualité des acides nucléiques obtenus : <ul style="list-style-type: none"> • La quantité obtenue est exprimée en ng/ul. La quantité minimale à obtenir pour que l'échantillon soit exploitable pour une analyse par qPCR par ces plaques est de 2,6 ng/ul. • La qualité obtenue est exprimée par le biais de 2 ratios qui doivent idéalement être supérieurs à 1,8 : <ul style="list-style-type: none"> - A260/A280 : si inférieur à 1,8 ce ratio indique la présence de protéines, phénols et autres contaminants. - A260/A230 : si inférieur à 1,8 ce ratio indique la présence de contaminants co-purifiés (solvants, sels, contaminants organiques). Cependant, ce rapport nous importe peu pour la réalisation d'une qPCR. <p>Si l'ADN est obtenu en trop faible quantité ou s'il est de trop mauvaise qualité vis-à-vis du rapport A260/A280, il est nécessaire de procéder à une nouvelle extraction car celui-ci ne sera pas exploitable pour la qPCR.</p> <ul style="list-style-type: none"> -Lancer l'analyse de chaque échantillon. -Nettoyer entre chaque échantillon avec un essuie-tout légèrement imbibé d'alcool -Récupérer le ticket d'analyse
CONSERVATION DE L'ADN	
11	Les éluions d'ADN seront conservées dans un congélateur à une température de -20°C après leur normalisation par quantification spectroscopique et avant l'étape de PCR quantitative.

3.2.7 PCR quantitative (qPCR)

La PCR quantitative (qPCR), ou PCR en temps réel, est une méthode particulière de réaction en chaîne par polymérase qui permet de mesurer la quantité initiale d'ADN. Elle a été découverte en 1983 par Karry Mullis. Elle repose sur le principe d'amplification d'une séquence

spécifique d'ADN avec l'aide de divers primers et enzymes. La PCR quantitative mesure en réalité le nombre d'amplicon (portion d'ADN définie par un couple d'amorces).

Afin de réaliser notre PCR quantitative nous utiliserons le système de *PCR multiplex par technologie BIOMARK™ HD system* de chez Fluidigm.

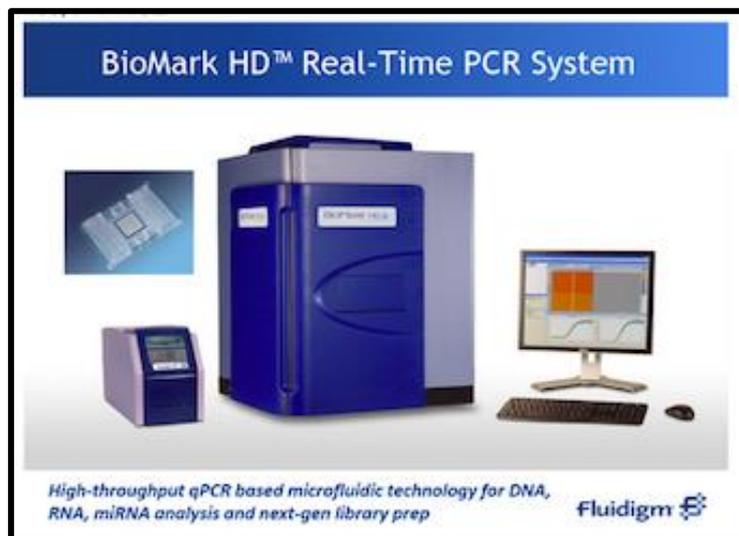


Figure 10 : Technologie BIOMARK™ HD system, Fluidigm

Le système *BIOMARK™ HD* permet de réaliser des milliers de réactions PCR individuelles en simultanée grâce à la technologie microfluidique. Les réactions PCR sont de l'ordre de quelques nanolitres. Adapté à notre panel d'agents microbiologiques à détecter, il devient possible d'analyser de manière simultanée plusieurs centaines d'échantillons. Cette technologie est robuste, sensible et de plus assez économique, elle se situe à la plateforme transcriptomique de l'Institut de Pharmacologie Cellulaire et Moléculaire (IPMC) du CNRS à Sophia-Antipolis. Cette plateforme dispose des automates (the *BIOMARK™ HD system*) et d'un savoir-faire éprouvé de ce type de technologie.

Ce système permet de quantifier simultanément l'expression de dizaines de gènes dans un grand nombre d'échantillons dans des puces microfluidiques. Chaque puce est constituée de chambres réactionnelles de petits volumes (0.85nL, 6nL ou 9nL) et d'un circuit fluide intégré (IFC pour Integrated Fluidic Circuit). Cet ensemble de micro-canaux connectés entre eux permet la circulation des fluides (échantillons, mix et amorces) et leur distribution dans des chambres réactionnelles pour ainsi paralléliser un grand nombre de réactions PCR quantitatives sur une petite surface. La circulation des fluides est assurée par des IFC contrôleurs, qui, par des différences de pression, provoquent l'ouverture ou la fermeture des valves *NanoFlex* pour la distribution et le mélange des échantillons et des amorces. L'amplification et la lecture de la fluorescence sont assurées par le système *BIOMARK™ HD*

system lui-même. Le *BIOMARK™ HD system* de la plateforme est complété par 3 types de contrôleurs IFC (AX, HX et MX) adaptés à 6 formats de puces différents.

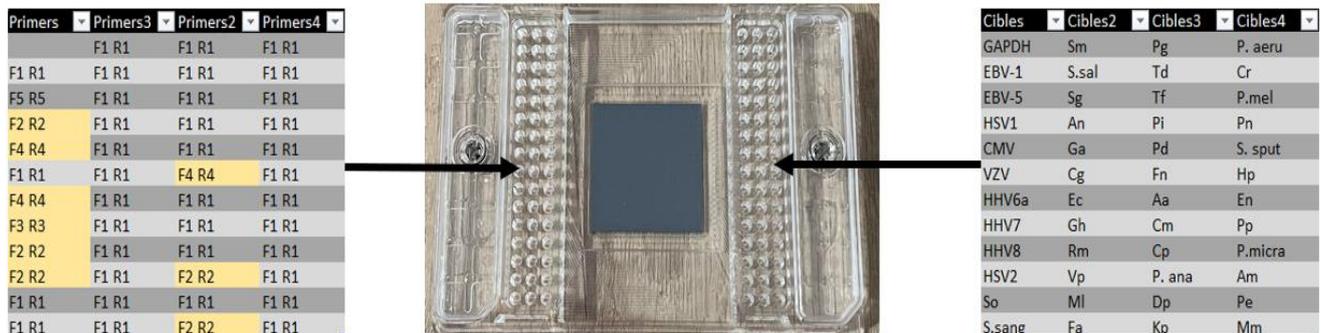


Figure 11 : Puce commercialisée par Biomark et utilisée dans cette étude, avec schématisation de la mise en place des primers et des cibles dans les puits

Dans le cadre de ce travail de thèse, une plaque Biomark BMK-M10- 48.48-EG de chez Standard Biotools a été utilisée (Figure 11), selon le plan de plaque suivant :

A gauche de la plaque ont été chargés les primers des différentes espèces ainsi que celui du gène endogène de la GAPDH⁸⁴. La GAPDH est présente dans toutes les cellules, et sa quantification permet une normalisation des valeurs retrouvées par analyse PCR dans les différents échantillons). A droite ont été chargés l'ADN extrait des différents échantillons et deux contrôles, un positif (contenant un mélange de tous les génomes) et un négatif (contenant de l'eau pure sans nucléase) afin de vérifier une éventuelle contamination. Chaque mesure a été réalisée en duplicat,

Nous devons initialement cibler uniquement les 8 HHV humains (HSV-1, HSV-2, VZV, EBV, CMV, HHV-6a, HHV-7, HHV-8), mais la taille de la plaque le permettant, nous avons finalement décidé de cibler en plus 38 bactéries représentant un échantillon de la flore orale pathogène et commensale.

Préalablement au remplissage de la plaque, des dilutions ont été effectuées afin de normaliser les concentrations des différents échantillons à une valeur de 2 ng/uL (Tableau4).

Colonne1	Colonne2	Echantillon	H2O
Samples	Concentration	Vi	qsp. 20uL
GM16b	74,2	0,5	19,5
GM16p	19,6	2,0	18,0
GM15b	26,0	1,5	18,5
GM15p	14,9	2,7	17,3
IJ04a	14,3	2,8	17,2
IJ04p	10,9	3,7	16,3
HF06a	30,0	1,3	18,7
HF06p	18,4	2,2	17,8
BM13b	17,1	2,3	17,7
BM13p	9,8	4,1	15,9
WB09a	16,8	2,4	17,6
WB09p	22,8	1,8	18,2
RJ10a	29,5	1,4	18,6
RJ10p	83,4	0,5	19,5
LP08a	28,7	1,4	18,6
LP08p	44,4	0,9	19,1
RE07a	46,7	0,9	19,1
RE07p	42,5	0,9	19,1
DF18b	7,9	5,1	14,9
DF18p	5,1	7,8	12,2
DC17b	8,4	4,8	15,2
DC17p	5,4	7,4	12,6

Tableau 3 : Tableau des dilutions

3.3 Résultats

Après avoir effectué des calculs sur les données issues de l'analyse, les résultats ont été traduits en copy numbers/Ug d'ADN. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau de l'annexe 2.

A partir de ces résultats ont été réalisés des tableaux reprenant les données des bactéries et des virus dont les données étaient les plus exploitables :

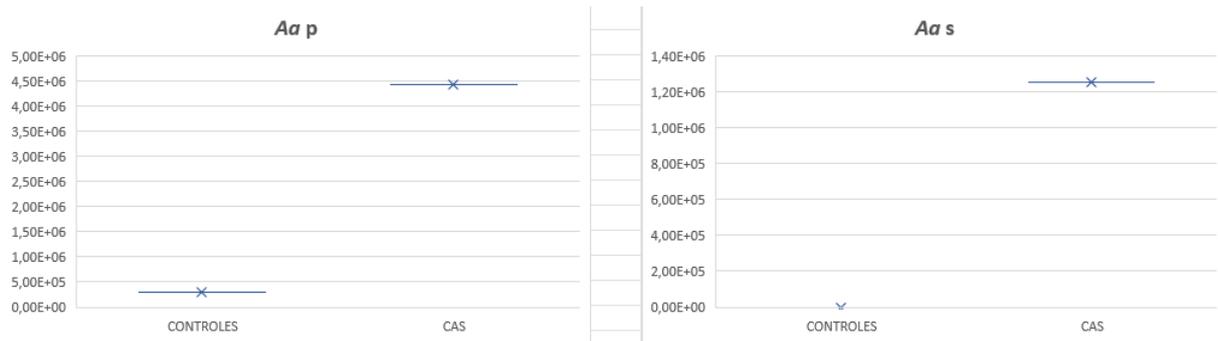


Figure 12 : Résultats pour la bactérie Aa

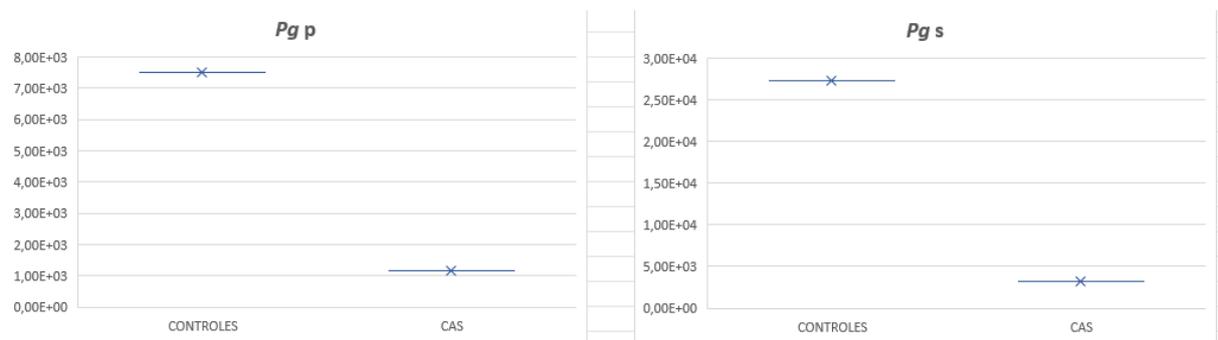


Figure 13 : Résultats pour la bactérie Pg

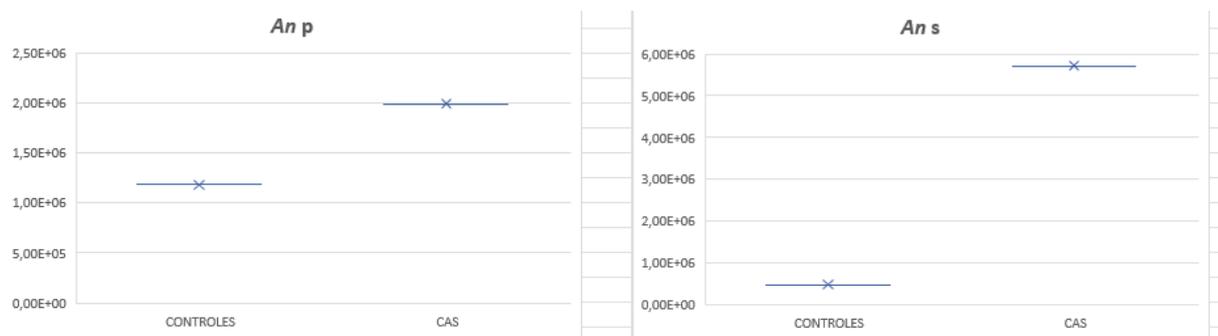


Figure 14 : Résultats pour la bactérie An

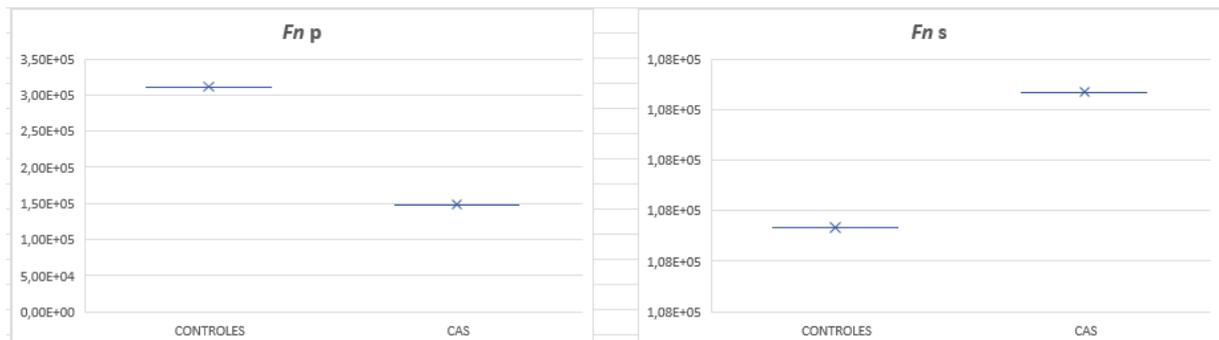


Figure 15 : Résultats pour la bactérie Fn

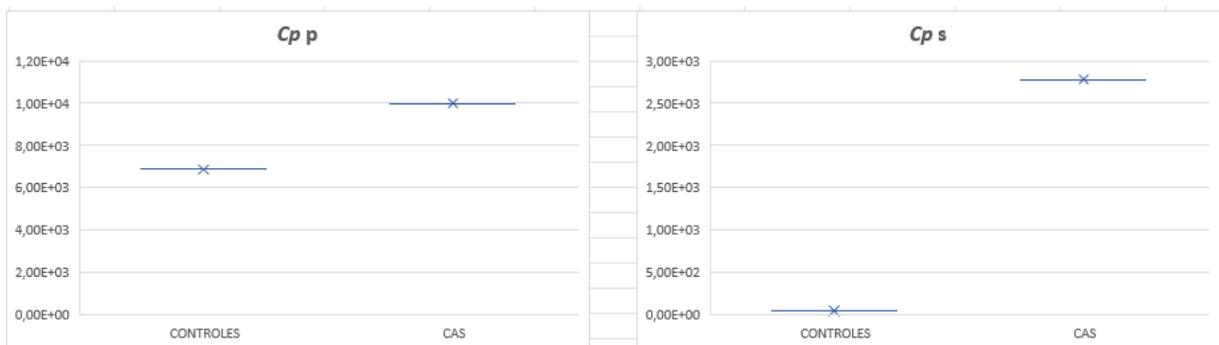


Figure 16 : Résultats pour la bactérie Cp

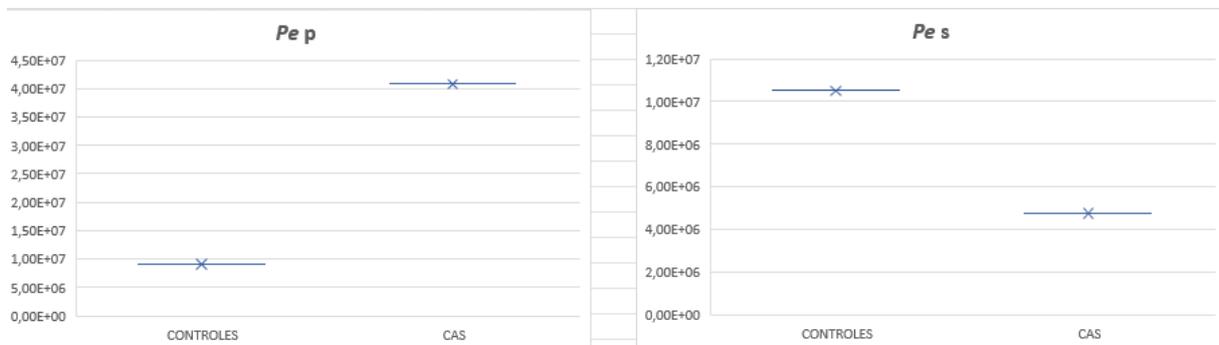


Figure 17 : Résultats pour la bactérie Pe

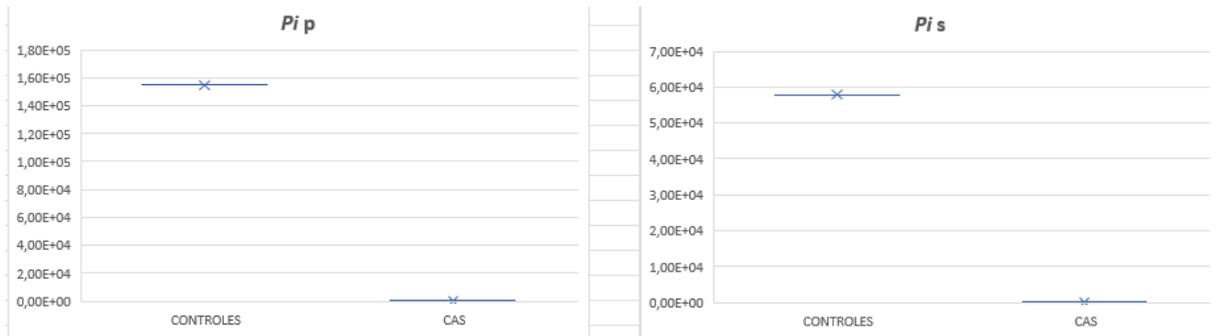


Figure 18 : Résultats pour la bactérie Pi

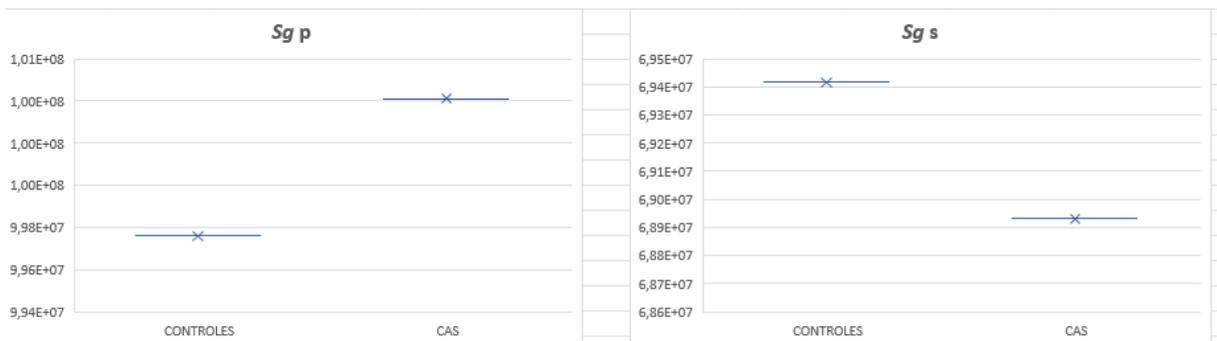


Figure 19 : Résultats pour la bactérie Sg

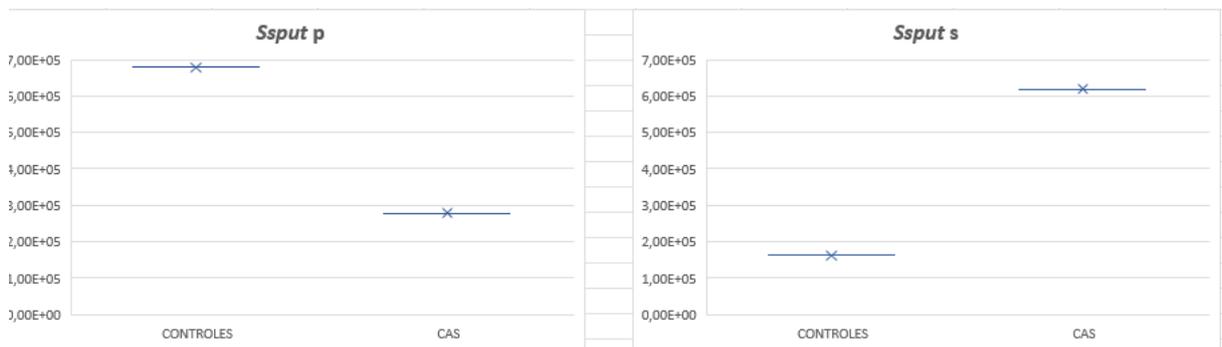


Figure 20 : Résultats pour la bactérie Ssput

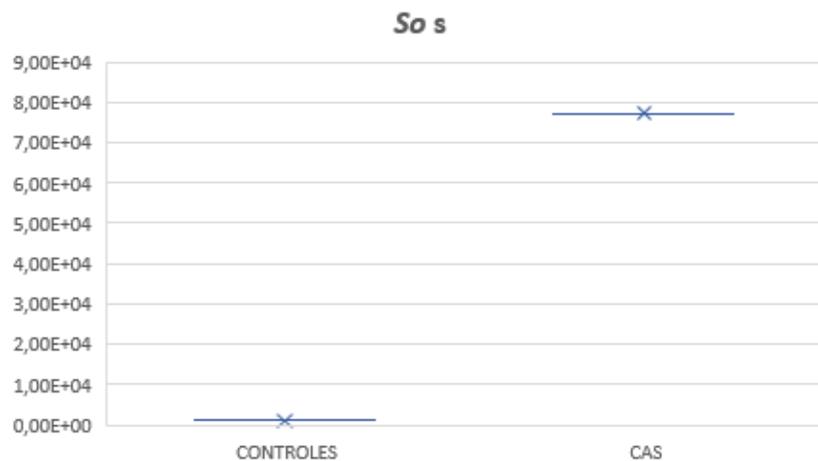


Figure 21 : Résultats pour la bactérie So

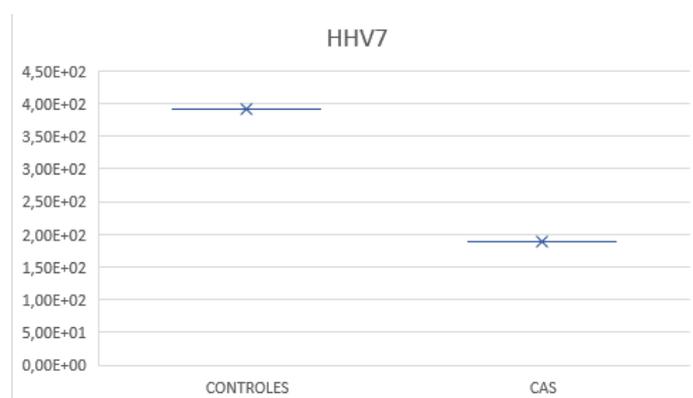


Figure 22: Résultats pour le virus HHV7

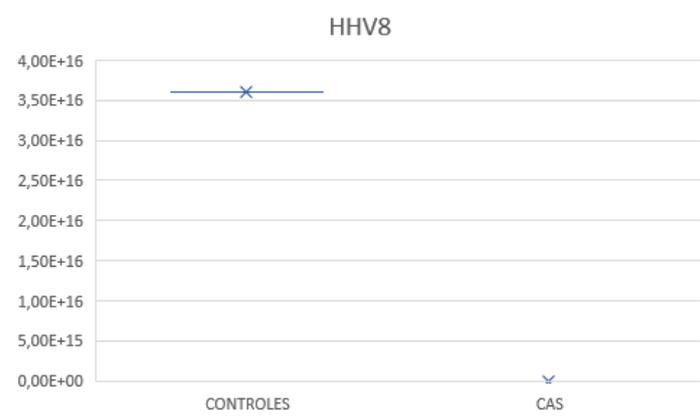


Figure 23 : Résultats pour le virus HHV8

Les lettres p et s noté à côté de l'abréviation de chaque pathogène représentent les mots « plaque » et « sulcus » afin d'indiquer la localisation des prélèvements.

Les premiers résultats obtenus suite à l'utilisation de la technologie PCR microfluidique Biomark HD sont malheureusement peu probants, notamment concernant les HHV. Cette technologie étant en cours de test au laboratoire Micoralis, des axes d'amélioration seront peut-être à envisager afin d'ajuster la précision du protocole.

Parmi ces potentiels axes d'amélioration, nous pouvons citer celui de la technique d'extraction de l'ADN puisque cette extraction entraîne le plus souvent une perte inévitable d'environ 50% du matériel génétique. Si nos manipulations semblaient satisfaisantes, des améliorations du protocole pourraient peut-être testées afin de limiter au maximum cette perte, d'autant que les prélèvements intrasulculaires contiennent beaucoup moins d'ADN que des prélèvements salivaires par exemple.

Un autre axe serait celui d'une pré-amplification plus importante des échantillons d'ADN avant la réalisation de la qPCR.

Une grande partie de nos échantillons (4 contrôles sur 5 et 5 cas sur 6) ont été positifs à HHV-8, or ce virus est loin d'être ubiquitaire. Dans la population adulte, sa séroprévalence globale varie de moins de 5 % dans la plupart des pays occidentaux (États-Unis, Europe du Nord) et en Asie du Sud-Est, à plus de 50 % en Afrique de l'Est et en Afrique centrale, et est de l'ordre de 10 à 20 % dans les pays du bassin méditerranéen (Italie, Grèce)⁸⁵. Comme celui-ci a été le seul vraiment détecté, avec HHV-7, peut-être le design des primers pour HHV-8 serait-il en cause.

Les patients inclus dans cette première phase d'étude étaient dans leur grande majorité, tant pour les cas que pour les contrôles, exempt de maladie parodontale sévère, avec des profondeurs de poche souvent comprises entre 1 et 3 mm, ce qui a dû encore entraîner une diminution de la quantité de pathogènes présents. En effet, certains HHV parodontaux étant étroitement associés à la parodontite, les sites dentaires atteints de parodontite sont des sites inflammatoires permanents ou les HV peuvent se répliquer activement sur le long terme contrairement aux sites non atteints, notamment par exemple pour le CMV⁸⁶. Ceci est de plus confirmé par la revue de littérature menée dans le cadre de ce travail ;

Une chose est sûre, une analyse par qPCR classique s'impose afin de confirmer ou infirmer ces premiers résultats et de pouvoir en fonction de ces derniers effectuer une mise au point de l'outil.

Du fait des résultats et du nombre restreint d'inclusions à ce stade, aucune analyse statistique n'a été effectuée, ce n'était d'ailleurs pas l'objet de ce travail qui consistait en un test d'une technologie nouvelle sur des échantillons parodontaux. Une analyse statistique sera bien effectuée pour l'ensemble des résultats de l'étude lorsque les inclusions seront terminées.

4. Conclusion et perspectives

Ce travail de thèse est constitué à la fois d'une revue systématique de la littérature et de la mise en œuvre d'un protocole expérimental permettant de tester la technologie *BIOMARK™ HD*, PCR en système microfluidique de chez Fluidigm sur des échantillons parodontaux de patients âgés atteints ou non de MA. La partie expérimentale a été réalisée au laboratoire MICORALIS, Faculté de chirurgie dentaire, Université Côte d'Azur (Dr. A. Doglio, Morgane Ortis) et à l'IPMC (Drs Mari et Fassy, IPMC, Sophia-Antipolis).

La revue systématique de la littérature réalisée a permis de conclure à un lien potentiel entre HHV et maladie parodontale. En effet, la grande majorité des études incluses montre une détection significativement plus importante des HHV dans les sites parodontaux atteints vs non atteints, particulièrement concernant HCMV et EBV.

Le protocole de recherche clinique expérimenté dans cette thèse a permis de tester une nouvelle technologie, le système *BIOMARK™ HD*, qui permet de réaliser des milliers de réactions PCR individuelles en simultanée grâce à la technologie microfluidique, sur des échantillons parodontaux, et de mettre en évidence de potentiels axes d'amélioration du protocole de mise en œuvre de cet outil.

A l'issue de ce travail et de l'étude qui en découlera, des données pourraient peut-être mettre en évidence un certain nombre de marqueurs parodontaux prédictifs du développement ou de l'évolution de la MA, avec à la clé un diagnostic précoce et un suivi facilité.

Annexes

Annexe 1 : Note d'information et formulaire de consentement

Centre Hospitalier Universitaire de Nice /
Laboratoire MICORALIS (Microbiologie orale, Immunothérapie et Santé)
Directeur : Dr Alain DOGLIO – Responsable : Dr Leslie BORSA
Faculté de Chirurgie dentaire, Pôle St Jean d'Angély – 5, rue du 22^{ème} BCA 06000 Nice
Téléphone: 04 92 03 43 52 - 04 89 15 22 46

NOTE D'INFORMATION DESTINÉE AU PATIENT

Madame, Monsieur,

Vous êtes venus consulter un médecin gériatre du Centre Hospitalier Universitaire de Nice, sur le site de l'Hôpital de Cimiez ou de l'Institut Claude Pompidou).

Le laboratoire de Microbiologie Orale, Immunothérapie et Santé (MICORALIS), dirigé par le Dr DOGLIO, est spécialisé dans l'étude des maladies de la bouche et de la flore microbienne orale. Ce laboratoire est affilié à l'Université Côte d'Azur et il est localisé dans les locaux de la Faculté de Chirurgie Dentaire au sein du Pôle Universitaire de St Jean d'Angély. MICORALIS développe de nombreux projets de recherche clinique et/ou fondamentale en collaboration étroite avec les Praticiens Hospitaliers du Centre Hospitalier Universitaire de Nice, du Centre Antoine Lacassagne, des équipes de recherche de l'ensemble du territoire national, des équipes internationales et éventuellement par des industriels.

Un projet d'étude clinique a été initié par le Laboratoire MICORALIS et destiné à mieux comprendre les liens entre microbiote oral et maladie d'Alzheimer, et nous souhaitons vous proposer de participer à cette étude, intitulée ORAMICAL.

Cette étude repose sur des prélèvements oraux, indolores, de plaque dentaire et de salive, ainsi que des prélèvements sanguins. A cette occasion, un bilan dentaire et parodontal complet vous serait également proposé. Nous souhaiterions conserver par congélation ces échantillons tissulaires. L'utilisation de ces prélèvements, dans cette finalité, n'aura aucune conséquence sur les traitements qui pourraient éventuellement vous être proposés dans le cadre de la consultation médicale de diagnostic de chutes ou de la maladie d'Alzheimer, mais pourrait vous permettre d'obtenir un diagnostic complet en matière bucco-dentaire, ainsi que les soins nécessaires le cas échéant.

L'étude qui est réalisée est une étude de clinique de type cas (personnes atteintes) / témoins (personnes non atteintes) réalisée pour mieux comprendre les mécanismes oraux qui pourraient être liés à la maladie d'Alzheimer; et, dans ce contexte, cette étude ne présentera pas de bénéfice immédiat pour vous, mais elle pourrait grandement contribuer à améliorer dans le futur la prise en charge de cette maladie.

Cette participation à ce projet de recherche est libre et ne donnera lieu à aucune indemnité.

Vous avez le droit de refuser de donner votre accord ou de retirer votre autorisation à tout moment, sans avoir à en expliquer les raisons et sans que votre décision influence en quoi que ce soit la qualité des soins que recevra votre enfant, et sans encourir aucune responsabilité ; vous devrez alors en informer le Dr BORSA qui est responsable de la mise en place de cette étude au 04 92 03 43 52. Les échantillons tissulaires seront alors détruits.

Traitement des données personnelles

Pour réaliser cette étude, il est en outre nécessaire de pouvoir disposer de données cliniques vous concernant. Comme vous le savez, celles-ci sont conservées dans votre dossier médical et gérées informatiquement, le traitement de ces données est conforme à la loi Informatique et Libertés n°78-17 du 6 Janvier 1978 modifiée et ainsi qu'au règlement (UE) 2016/679 du Parlement européen et du Conseil du 27 avril 2016 (règlement général sur la protection des données). Le responsable du traitement informatique est le Directeur Général du CHU de Nice. Le CHU de Nice a désigné un Délégué à la Protection des Données (DPO) que vous pouvez joindre au dpo@chu-nice.fr et qui pourra répondre à toutes vos questions concernant la protection des données personnelles.

Ces données médicales fournissent des renseignements indispensables pour mener à bien ces travaux ; en effet, les nouvelles connaissances sur les maladies sont produites grâce au rapprochement des résultats de la recherche scientifique avec des données cliniques des maladies et de leur évolution. Les données vous concernant (deux premières lettres du nom patronymique et du prénom, âge, l'historique géographique, données cliniques, biologiques, histologiques et de conservation) peuvent être conservées dans une base de données pendant une durée de dix ans après la destruction de l'échantillon

biologique. La licéité de ce traitement informatique est l'intérêt légitime poursuivi par le CHU de Nice à des fins d'amélioration du suivi de certaines pathologies, à des fins de recherche scientifique et de publications.

L'accès direct à ces différentes données se fera sous la responsabilité d'un médecin par des personnes soumises au secret professionnel et collaborant à la constitution de cette biobanque.

Dans le cadre de certains projets de recherche, le CHU de Nice peut également être amené, après vous avoir informé individuellement et sauf opposition de votre part, à transmettre vos données non-nominatives à d'autres professionnels de santé, le résultat de ces exploitations ne pouvant permettre de vous ré-identifier. Dans ce cadre, les informations vous concernant sont susceptibles d'être déposées chez un hébergeur de données de santé certifié à cet effet et traitées par des partenaires externes intervenant dans la recherche.

La mise en place d'une recherche des caractéristiques génétiques constitutionnelles et la cession d'échantillons à partir d'échantillons biologiques tissulaires et/ou de fluides congelés ou à température ambiante (dont les vôtres), feront l'objet d'une information et d'un consentement qui vous seront transmis afin de recueillir votre décision à cette nouvelle utilisation.

Conformément à la réglementation applicable, vous disposez de différents droits à savoir : droit à l'information, droit d'accès, droit de rectification, droit à l'effacement, droit à la limitation du traitement de vos données personnelles, droit d'opposition, droit de retirer votre consentement, droit à la portabilité des données (vous pouvez si vous le désirez récupérer vos données pour votre usage personnel ou si cela est possible les transférer à un tiers) (pour plus d'informations contacter le DPO).

Vous pouvez exercer votre droit d'accès et de rectification aux informations qui vous concernent, une limitation du traitement relatif à votre personne, retirer votre consentement ou exercer votre droit à la portabilité en écrivant au Directeur Général / Délégué à la Protection des Données (DPO) du CHU de NICE (Mail à dpo@chu-nice.fr ou Courrier à A l'attention du Délégué à la Protection des données (DPO), Hôpital de Cimiez, 4 ave de la Reine Victoria – CS 91179 – 06003 Nice Cedex.) De même, vous pouvez vous opposer à votre participation à un traitement des données vous concernant pour des motifs légitimes, sans que cela ne modifie en aucune façon la prise en charge médicale réalisée par votre médecin.

Vous avez également le droit de porter une réclamation auprès de la Commission nationale Informatique et Libertés si vous estimez que vos données ne sont pas traitées conformément à la réglementation des données personnelles.

Votre accord de participation

Conformément à l'article L1211-2 du code de la santé publique (loi 2004-800 du 06 août 2004), votre accord d'autorisation est nécessaire pour que :

- des fluides et déchets biologiques non sanguins (salive et plaque dentaire) soient prélevés dans votre bouche.
- un prélèvement sanguin vous soit effectué
- ces échantillons biologiques soient utilisés dans le futur à des fins de recherche scientifique, dans le cas où vos caractéristiques génétiques propres devraient être utilisées dans des projets spécifiques, vous serez sollicité pour un nouveau consentement dédié à cette étude.
- vos données cliniques et histologiques (étude des tissus) rendues non nominatives soient centralisées dans une base de données et mise à disposition des cliniciens et des chercheurs sous la responsabilité du Dr DOGLIO, **Directeur du laboratoire MICORALIS**

Cet accord est révoquant à tout moment. Afin d'exprimer votre souhait, nous vous demandons de bien vouloir lire et signer le consentement éclairé qui se trouve à la suite de cette note d'information.

Quelle que soit votre décision, nous tenons à vous remercier de l'attention que vous avez portée à la lecture de ce document. Si vous souhaitez obtenir des informations complémentaires, vous pouvez contacter le Dr BORSA responsable de l'étude au 04 92 03 43 52.

Paraphe du patient

CONSENTEMENT DE CONSERVATION D'ECHANTILLONS BIOLOGIQUES ET TISSULAIRES
ET D'UTILISATION DES DONNEES PERSONNELLES RENDUES NON NOMINATIVES

Je soussigné(e),

Nom Prénom Date de naissance : / /

Suite à la lecture ce jour, des informations présentes dans la note ci-jointe et aux explications données par le médecin, notamment sur :

- La réalisation de prélèvements salivaires et de plaque dentaire sur le fauteuil dentaire de l'annexe du pôle Odontologie du Pr Claire LASSAUZAY (Centre Hospitalier Universitaire de Nice – Hôpital de Cimiez) et leur conservation pour « archivage » dans le cadre de la création d'une biobanque au Centre Hospitalier Universitaire de Nice (CHUN),
- La réalisation de prélèvements sanguins sur l'HDJ par un infirmier (Centre Hospitalier Universitaire de Nice – Hôpital de Cimiez) et leur conservation pour « archivage » dans le cadre de la création d'une biobanque au CHUN,
- La réalisation à partir de ces échantillons, de cultures cellulaires permettant la mise en évidence de certaines espèces bactériennes et virales,
- L'utilisation de ces échantillons de fluides et déchets biologiques (salive et plaque dentaire) à visée de recherche,
- La constitution d'une base de données médicales comprenant certaines de mes données cliniques rendues non nominatives qui pourra être mise à disposition des cliniciens et des chercheurs sous la responsabilité du Pr Hofman, responsable de la biobanque à des fins de recherche médicale,
- Les différents droits liés au traitement de mes données personnelles.

Le Docteur BORSA Leslie m'a expliqué la nature des études éventuelles qui pourront, dans le futur, être effectuées sur les échantillons de fluides et de déchets biologiques prélevés et conservés par les équipes du Centre Hospitalier universitaire de Nice (INSERM / CNRS), du Centre Antoine Lacassagne, de l'Université de Nice Sophia Antipolis ou d'autres équipes nationales, internationales et éventuellement par des industriels, et le fait qu'elles feront appel aux techniques de biologie cellulaire et moléculaire, qu'elles pourront nécessiter potentiellement un examen des caractéristiques liées à ma pathologie diagnostiquée qu'elles pourront s'étendre sur plusieurs années et que mes échantillons biologiques seront conservés en ce sens pour une durée de 20 années reproductibles tacitement à partir de la date de leur prélèvement.

D'autre part, j'ai été informé(e) que la création de cette biobanque ne comportait aucun risque pour moi, qu'elle était sans bénéfice direct pour moi, puisque l'objectif de cette étude est collectif, et permettra de mieux traiter les patients dans le futur.

J'ai été informé(e) :

- De la nature des informations transmises
- De la finalité du traitement des données
- Du fait que certaines données rendues non nominatives me concernant feront l'objet d'un traitement informatisé, respectant la loi Informatique et Libertés n°78-17 du 6 Janvier 1978 modifiée le 20 juin 2018 et ainsi au règlement (UE) 2016/679 du Parlement européen et du Conseil du 27 avril 2016 applicable à compter du 25 mai 2018 (règlement général sur la protection des données)
- Des différents droits dont je dispose concernant le traitement de mes données: droit d'accès et de rectification de ces données, droit d'opposition au traitement automatisé des données nominatives me concernant.

Des réponses ont été apportées à toutes mes questions. J'ai disposé d'un délai de réflexion avant de prendre ma décision.

Mon autorisation ne décharge pas les responsables de la tissuthèque de leur responsabilité.

J'ACCEPTE DE DONNER MON CONSENTEMENT POUR L'UTILISATION D'ECHANTILLONS ISSUS DU SOIN A DES FINS DE RECHERCHES SCIENTIFIQUES. J'ACCEPTE QUE LES DONNEES MEDICALES RENDUES NON NOMINATIVES RECUEILLIES PENDANT MES SOINS ET ASSOCIEES AUX ECHANTILLONS SOIENT L'OBJET D'UN TRAITEMENT INFORMATISE ET D'UNE DIFFUSION DANS LE CADRE DE PROJETS DE RECHERCHE.

JE REFUSE DE DONNER MON CONSENTEMENT POUR L'UTILISATION D'ECHANTILLONS BIOLOGIQUES ET DONNEES ASSOCIEES ISSUS DU SOIN.

Je sais que ma décision est révoquée, et qu'en cas de changement de décision de ma part, je pourrai demander la destruction des échantillons provenant de ma personne et qui sont encore conservés au sein du Laboratoire MICORALIS uniquement pour des raisons scientifiques ainsi que les données médicales associées.

Fait en double exemplaire dont un remis au patient.

A.....le

A.....le

Signature du Médecin

Signature du sujet précédé(e)
de la mention « lu et approuvé »

Annexe 2 : CRF (Case report form)



Service coordonnateur

Délégation à la Recherche
Clinique et à l'Innovation

Analyse du microbiote parodontal chez des sujets âgés diagnostiqués
pour la maladie d'Alzheimer : Etude de cas/témoins

ORAMICAL (oral microbiology in Alzheimer's patients)

21-AOI-05

CAHIER D'OBSERVATION

N° du patient (ou code patient) : |_|_|_|

Initiales du patient : |_| - |_|

(1^{re} lettre du nom - 1^{re} lettre du prénom)

Promoteur :

CHU de Nice
DRCI – Hôpital de Cimiez
4, avenue Reine Victoria - BP 1179 - 06003 Nice
☎ : 04 92 03 40 11 📠 : 04 92 03 40 75
@ : drc@chu-nice.fr

Investigateur coordonnateur :

BORSA Leslie
Odontologie
CHU de Nice - Hopital St Roch
☎ : 04.92.03.43.52 - 📠 : 04.92.03.41.19
@: leslie.borsa@univ-cotedazur.fr
borsa.l@chu-nice.fr

Code interne	Instructions
21-AOI-05	

FICHE D'INSTRUCTION POUR REMPLIR LE CAHIER D'OBSERVATIONS

- 1 - GENERALITES :**
- Ecrivez dans l'espace réservé,
 - Ecrivez les mots en majuscules,
 - Utilisez un stylo à bille noir,
 - N'utilisez pas d'abréviations,
 - Complétez l'en-tête sur chaque page.

2 - CASES :

Cases ouvertes (râteaux |_|_|_|_|) : n'inscrivez qu'1 seul caractère par case.

Cases fermées : cochez la réponse correspondante

- Valeurs numériques
 - cadrez les valeurs numériques à droite.
 - ne laissez pas de cases vides, mettez zéro. Ex : Incorrect : |_2_|_1_|_|_| Correct : |_0_|_2_|_1_|_|
 - n'ajoutez pas de virgules, elles sont pré-codées si nécessaire, appliquez si besoin la règle d'arrondi.
- Dates : indiquez les dates sous la forme Jour/Mois/Année (jj/mm/aaaa), excepté pour la date de naissance qui doit être recueillie en Mois/Année (mm/aaaa).

3 - ERREURS :

Vous devez, en cas d'erreur, barrer l'information erronée par un simple trait afin qu'elle reste visible, noter la correction à côté, signer et dater. Vous ne devez pas utiliser de correcteur.

4 - FIN D'ETUDE :

Quand la participation du patient se termine, que cela soit au terme de l'étude ou de manière prématurée, vous devez remplir la fiche de fin d'étude.

- **La date de fin d'étude :**
= date de dernière information recueillie dans le cadre de l'étude : aucun examen lié à l'étude, ni administration du traitement à l'étude, ni recueil de données ne sera fait après cette date.
La date de fin d'étude peut être la date de la dernière visite effectuée ou la date de la dernière information (examen, EI...) recueillie dans le cadre de cette visite.

- **Arrêt prématuré :**
Si le patient sort de l'étude avant le terme de l'étude, veuillez préciser le motif de cet arrêt prématuré. En cas de doute, n'hésitez pas à contacter l'ARC promoteur.
Arrêt prématuré par la volonté du patient: Le patient peut, en effet, décider à tout moment d'interrompre sa participation à l'étude (refus de poursuivre / retrait de consentement). Toutes les données collectées jusqu'à l'arrêt seront colligées et analysées (Loi Jardé - Article L.1121-1-1 du CSP, version au 18 novembre 2016).

5 - RECUEIL DES EVENEMENTS INDESIRABLE DANS LE TABLEAU DU CRF (si applicable, catégorie 1):

Doivent être recueillis tous les Evènements Indésirables survenus pendant la durée de l'étude.

- **Définition :**

Un évènement indésirable (EI) est défini comme toute manifestation nocive et non recherchée chez un participant à un essai clinique, que cette manifestation soit liée ou non à la recherche ou au traitement sur lequel porte cette recherche.

Code interne	N° Patient	Visite de Sélection
21-AOI-05	_ _ _ _	

VISITE DE SELECTION

Date : |_ _| _| | / |_ _| _| | / |_ _| _| _| _| | (JJ/MM/AAAA)

RECUEIL DU CONSENTEMENT

Je certifie avoir recueilli le consentement libre et éclairé du patient le
|_ _| _| | / |_ _| _| | / |_ _| _| _| _| | avant toute procédure.

Nom de l'investigateur : _____

Signature de l'investigateur :

DEMOGRAPHIE

Date de naissance : |_ _| _| _| | / |_ _| _| _| _| | (MM/AAAA) Age : |_ _| _| | ans

Sexe : Masculin Féminin

EXAMEN CLINIQUE

- Poids : |_ _| _| _| _| |, |_ _| | kg
- Taille : |_ _| _| _| _| | cm
- Tension artérielle : PAS |_ _| _| _| _| | / PAD |_ _| _| _| _| | mm Hg
- Pouls : |_ _| _| _| _| | bpm
- Température : |_ _| _| _| |, |_ _| | °C
- Examen clinique général : Normal Anormal
 ☞ Si Anormal, précisez :

HISTOIRE DE LA MALADIE : MALADIE D'ALZHEIMER

- Date du diagnostic de la maladie : |_ _| _| _| | / |_ _| _| _| | / |_ _| _| _| _| | (JJ/MM/AAAA)
- Stade de la pathologie :
- Commentaires éventuels :

Code interne	N° Patient	Visite de Sélection
21-AOI-05	_ _ _	

ANTECEDENTS MEDICAUX ET PATHOLOGIES ASSOCIEES

Le patient a-t-il des antécédents (médicaux et/ou chirurgicaux) et/ ou des pathologies associées ?

Oui Non

↳ Si Oui, merci de compléter le tableau ci-dessous

Antécédents et autres pathologies associées	Date de début (MM/AAAA)	Toujours en cours	
		Oui	Non
.....	_ _ _ / _ _ _ _	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
.....	_ _ _ / _ _ _ _	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
.....	_ _ _ / _ _ _ _	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
.....	_ _ _ / _ _ _ _	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
.....	_ _ _ / _ _ _ _	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
.....	_ _ _ / _ _ _ _	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

TRAITEMENTS ANTERIEURS / TRAITEMENTS EN COURS....

- Traitement antérieurs:

- Antécédents de chirurgie buccale dans les deux mois précédant le prélèvement Oui Non

- Antécédents de traitement par rétinoïdes oraux, bisphosphonates, anticoagulants oraux ou anticonvulsivants Oui Non

↳ si Oui, merci de préciser dans le tableau ci-dessous

- Antécédents de chimiothérapie (6 derniers mois) Oui Non

↳ si Oui, merci de préciser dans le tableau ci-dessous

- Antécédents de traitement antibiotique, anti-inflammatoire ou de bain de bouche (4 dernières semaines) Oui Non

↳ si Oui, merci de préciser dans le tableau ci-dessous

Code interne	N° Patient	Visite de Sélection
21-AOI-05	_ _	

FICHE TRAITEMENTS ANTERIEURS								
	Médicament				Indication (optionnelle)	Date de début (JJ/MM/AAAA)	Date de fin	
	DCI/Nom commercial	Dose quotidienne (Jour)	Unité	Voie*			Date de fin (JJ/MM/AAAA)	En cours
1	___/___/_____	___/___/_____	<input type="checkbox"/>
2	___/___/_____	___/___/_____	<input type="checkbox"/>
3	___/___/_____	___/___/_____	<input type="checkbox"/>
4	___/___/_____	___/___/_____	<input type="checkbox"/>
5	___/___/_____	___/___/_____	<input type="checkbox"/>
6	___/___/_____	___/___/_____	<input type="checkbox"/>

Code interne	N° Patient	Visite de Sélection
21-AOI-05	_ _	

- **Traitement(s) concomitants ?**

☞ si Oui, remplir la fiche **TRAITEMENTS CONCOMITANTS**

Note : Le traitement de fond du patient (lié à sa pathologie) est un traitement concomitant à l'essai.

Code interne	N° Patient	Visite d'inclusion
21-AOI-05	_ _ _	

VISITE D'INCLUSION

Date : |_|_| / |_|_| / |_|_|_|_| (JJ/MM/AAAA)

CRITERES DE SELECTION

CRITERES D'INCLUSION	Oui	Non
1. Age supérieur ou égal à 70 ans	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. Patient (ou personne de confiance) ayant lu et compris la note d'information relative à l'étude, et signé le formulaire de consentement éclairé	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. Affiliation à un régime de sécurité sociale	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. Pour les cas : Diagnostic de maladie d'Alzheimer possible ou probable selon le DSM	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. Signature d'un consentement éclairé.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Si une ou plusieurs cases « NON » sont cochées le patient n'est pas inclus dans l'étude

CRITERES DE NON-INCLUSION	Oui	Non
1. Présence d'une pathologie neuro-dégénérative (hors maladie d'Alzheimer pour les cas)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. Présence d'un trouble neurocognitif (hors maladie d'Alzheimer pour les cas)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. Patient présentant ou ayant présenté toutes sortes de cancers, y compris buccal ou des voies aéro-digestives	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. Patient présentant ou ayant présenté des maladies auto-immunes (VIH, hépatite)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. Patient présentant des maladies inflammatoires (type polyarthrite rhumatoïde (PAR) ou syndrome de Gougerot-Sjogren (SGJ))	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6. Patient présentant une hémopathie grave	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7. Patient présentant une pathologie aigüe ou chronique sévère cardio-vasculaire, rénale, hépatique, gastro-intestinale, allergique, endocrinienne, pulmonaire, neuropsychiatrique, jugée par l'investigateur comme incompatible avec la réalisation de l'étude car toutes ces pathologies peuvent interférer avec les résultats de prélèvement de la flore orale	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
8. Patient ayant subi une intervention de chirurgie orale dans les deux mois précédant les prélèvements	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9. Patient traité par rétinoïdes par voie orale, bisphosphonates, anticoagulants oraux ou anticonvulsivants		
10. Patient ayant eu une chimiothérapie anti-cancéreuse ou		

Code interne	N° Patient	Visite d'inclusion
21-AOI-05	_ _	

immunosuppressive dans les 6 derniers mois		
11. Patient ayant eu un traitement antibiotique ou anti-inflammatoire dans les 4 dernières semaines		
12. Un historique des traitements (médicaments et probiotiques) pris au cours du mois précédant le prélèvement sera effectué, ainsi qu'un relevé des habitudes toxiques (tabac, alcool, autres)		
13. Patients protégés par la loi sous tutelle ou sous curatelle, ou ne pouvant pas participer à une étude clinique au titre de l'article L. 1121-16 du Code français de Santé Publique		

Si une ou plusieurs cases « OUI » sont cochées le patient n'est pas inclus dans l'étude

Le patient est-il inclus dans l'étude ? Oui Non

Si Non, précisez la raison :

Commentaire :

Code interne	N° Patient	Visite d'inclusion
21-AOI-05	_ _	

VISITE DE RECUEIL DES DONNEES (le jour de la visite d'inclusion)

EXAMEN ODONTOLOGIQUE (CHIRURGIEN-DENTISTE)

NON FAIT

-Etat bucco-dentaire:

1. Prothèses dentaires :

Présence Oui Non

Niveau d'adaptation : Satisfaisant Non satisfaisant Non applicable

2. Coefficient masticatoire (en %) |_|_|_|_|% sur 100%

																		=
2	5	5	3	3	4	1	2	%	2	1	4	3	3	5	5	2		= 50
18	17	16	15	14	13	12	11		21	22	23	24	25	26	27	28		
48	47	46	45	44	43	42	41		31	32	33	34	35	36	37	38		
3	5	5	3	3	4	1	1	%	1	1	4	3	3	5	5	3		= 50
																		=

Dent saine avec engrenement normal avec la dent antagoniste : valeur maximale associée à cette dent

Dents altérées : valeur diminuée en fonction du retentissement sur l'engrenement

Absence d'une ou plusieurs dents : valeur nulle ainsi que pour la ou les antagonistes

Contact inexistant entre antagonistes : valeur nulle

Prothèses, fixes ou mobiles : valeur des dents qu'elles remplacent si elles assurent un engrenement normal

Toutes les dents présentes avec un engrenement normal : le coefficient masticatoire est de 100 %

3. Présence des mobilités dentaires : Oui Non

Si oui graduation selon la classification de Mühlemann (1951) :

Degré 0 : mobilité physiologique

Degré 1 : déplacement transversal < 1mm

Degré 2 : déplacement transversal > 1mm

Degré 3 : déplacement axial

4. Stade de l'atteinte carieuse (si présence) : CAOD

Nombre de dents cariées (C) : |_|_|_|

Nombre de dents absentes (A) : |_|_|_|

Nombre de dents obturées (O) : |_|_|_|

}

Total : |_|_|_| sur 28

Code interne	N° Patient	Visite d'inclusion
21-AOI-05	_ _	

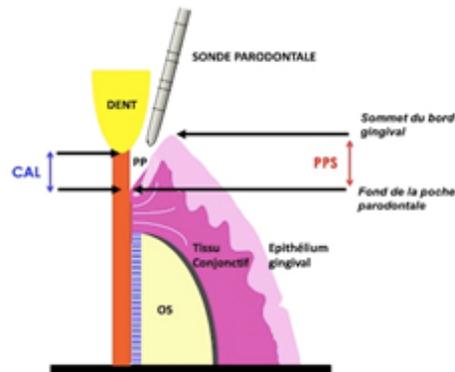
-Diagnostic parodontal (charting)

1. CAL « Clinical attachment Level » Niveau d'attache clinique :

- 4 sites par dent (mésial, distal, vestibulaire et lingual), en mm
- Profondeur entre jonction amélo-cémentaire de la dent et fond de la poche/du sulcus
- CAL < ou = 1mm : situation physiologique
- CAL > 2mm : situation pathologique

2.PPS « periodontal pocket depth » Profondeur des poches parodontales au sondage :

- 4 sites par dent (mésial, distal, vestibulaire et lingual), en mm
- Profondeur entre rebord gingival et fond de la poche/du sulcus
- PPS < ou = 3mm: situation physiologique (sulcus parodontal)
- PPS > 3mm: situation pathologique (poche parodontale)



3. BOP « Bleeding on probing » Indice de saignement au sondage :

- 4 sites par dent (mésio-vestibulaire, disto-vestibulaire, mésio-palatin et disto-palatin), en %
- 0 = absence de saignement au sondage
- 1 = présence de saignement au sondage
- Nombre de sites présentant des saignements divisé par le nombre total de sites mesurés x 100
- BOP < 10 % : santé gingivale sur parodonte intact ou sur parodonte réduit avec ou sans antécédent de maladie parodontale

4. PI : « Plaque Index » Indice de plaque (de 0 à 3):

- □PI0 : Absence de plaque
- □PI1 : Plaque non visible à l'œil nu, détectable à la sonde
- □PI2 : Plaque visible à l'œil nu
- □PI3 : Dépôts abondants

Code interne	N° Patient	Visite d'inclusion
21-AOI-05	_ _ _ _	

CHARTING PARODONTAL REPRENANT LES DIFFERENTS INDICES CITES :

	18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
Mobilité	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Implant																
Furcation																
Saignement au sondage																
Plaque																
Niveau gingival	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Profondeur de sondage (poche)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vestibulaire																
Palatin																
Niveau gingival	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Profondeur de sondage (poche)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Plaque																
Saignement au sondage																
Furcation																
Note																

Prof. de sondage moyenne = 0 mm Niv. d'attache moyen = 0 mm 0 % Plaque 0 % Saignement au sondage

Note																
Furcation																
Saignement au sondage																
Plaque																
Niveau gingival	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Profondeur de sondage (poche)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lingual																
Vestibulaire																
Niveau gingival	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Profondeur de sondage (poche)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Plaque																
Saignement au sondage																
Furcation																
Implant																
Mobilité	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38

Code interne	N° Patient	Visite d'inclusion
21-AOI-05	_ _	

-Besoin d'un détartrage Oui Non

EXAMENS SPECIFIQUES A L'ETUDE

-IRM REALISE NON REALISE
 RESULTAT : _____

-PONCTION LOMBAIRE REALISE NON REALISE
 RESULTAT : _____

AUTRES DONNEES A RECUEILLIR NON FAIT

-Diagnostic neuro-cognitif : Patient témoin : NA

score MMSE* : _____

*réalisé (ou récupéré si un score est déjà connu pour une période inférieure à 6 mois avant le recrutement).

-Prélèvement sanguin

Taux sanguin des marqueurs pro-inflammatoires circulants :

- IL-1 : | _ _ _ _ _ | pg/ml
- IL-6 : | _ _ _ _ _ | pg/ml
- TNF-R1 : | _ _ _ _ _ | pg/ml
- TNF-R2 : | _ _ _ _ _ | pg/ml
- α1- ACT : | _ _ _ _ _ | pg/ml
- sCD40L : | _ _ _ _ _ | pg/ml
- hsCRP : | _ _ _ _ _ | pg/ml
- IL-8 : | _ _ _ _ _ | pg/ml
- MCP-1 : | _ _ _ _ _ | pg/ml

-Prélèvement de plaque à la curette et prélèvement parodontal intra-sulculaire avec pointes papier recueillis dans des tubes de prélèvements biologiques (chacun comportera le numéro d'inclusion et les initiales de chaque patient par le chirurgien-dentiste investigateur.

Extraction des ADN (génomés microbiens, bactériens et viraux) à partir des 2 prélèvements oraux du patient :

- Quantité d'ADN échantillon de plaque : | _ | _ | _ | ng/ml

Code interne	N° Patient	Visite d'inclusion
21-AOI-05	_ _	

- Quantité d'ADN échantillon de microbiote intra-sulculaire : |_|_|_|_| ng/ml

Quantification des ADN par qPCR :

Agents pathogènes ciblés :

- 9 herpes virus humains (HHV):

<i>Herpes Simplex Virus -1 (HSV-1 ou HHV-1),</i>	<input type="checkbox"/> ++	<input type="checkbox"/> +	<input type="checkbox"/> +/-	<input type="checkbox"/> -
<i>Herpès Simplex Virus -2 (HSV-2, ou HHV-2),</i>	<input type="checkbox"/> ++	<input type="checkbox"/> +	<input type="checkbox"/> +/-	<input type="checkbox"/> -
<i>VZV (varicelle zona, ou HHV-3),</i>	<input type="checkbox"/> ++	<input type="checkbox"/> +	<input type="checkbox"/> +/-	<input type="checkbox"/> -
<i>Epstein Barr Virus (EBV, ou HHV-4) ;</i>	<input type="checkbox"/> ++	<input type="checkbox"/> +	<input type="checkbox"/> +/-	<input type="checkbox"/> -
<i>Cytomégalo virus (CMV, ou HHV-5),</i>	<input type="checkbox"/> ++	<input type="checkbox"/> +	<input type="checkbox"/> +/-	<input type="checkbox"/> -
<i>HHV-6A,</i>	<input type="checkbox"/> ++	<input type="checkbox"/> +	<input type="checkbox"/> +/-	<input type="checkbox"/> -
<i>HHV-6B,</i>	<input type="checkbox"/> ++	<input type="checkbox"/> +	<input type="checkbox"/> +/-	<input type="checkbox"/> -
<i>HHV-7,</i>	<input type="checkbox"/> ++	<input type="checkbox"/> +	<input type="checkbox"/> +/-	<input type="checkbox"/> -
<i>HHV-8 (ou kaposi virus)</i>	<input type="checkbox"/> ++	<input type="checkbox"/> +	<input type="checkbox"/> +/-	<input type="checkbox"/> -

- 25 bactéries parodontales

Bactéries parodontopathogènes:

<i>Eikenella corrodens</i>	<input type="checkbox"/> ++	<input type="checkbox"/> +	<input type="checkbox"/> +/-	<input type="checkbox"/> -
<i>Prevotella melaninogenica</i>	<input type="checkbox"/> ++	<input type="checkbox"/> +	<input type="checkbox"/> +/-	<input type="checkbox"/> -
<i>Streptococcus mitis</i>	<input type="checkbox"/> ++	<input type="checkbox"/> +	<input type="checkbox"/> +/-	<input type="checkbox"/> -
<i>Streptococcus oralis</i>	<input type="checkbox"/> ++	<input type="checkbox"/> +	<input type="checkbox"/> +/-	<input type="checkbox"/> -
<i>Streptococcus sanguis</i>	<input type="checkbox"/> ++	<input type="checkbox"/> +	<input type="checkbox"/> +/-	<input type="checkbox"/> -

Bactéries commensales :

<i>Actinomyces naeslundii</i>	<input type="checkbox"/> ++	<input type="checkbox"/> +	<input type="checkbox"/> +/-	<input type="checkbox"/> -
<i>Aggregatibacter Actinomycetemcomitans</i>	<input type="checkbox"/> ++	<input type="checkbox"/> +	<input type="checkbox"/> +/-	<input type="checkbox"/> -
<i>Campylobacter rectus</i>	<input type="checkbox"/> ++	<input type="checkbox"/> +	<input type="checkbox"/> +/-	<input type="checkbox"/> -
<i>Eubacterium nodatum</i>	<input type="checkbox"/> ++	<input type="checkbox"/> +	<input type="checkbox"/> +/-	<input type="checkbox"/> -
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<input type="checkbox"/> ++	<input type="checkbox"/> +	<input type="checkbox"/> +/-	<input type="checkbox"/> -
<i>Peptostreptococcus micros</i>	<input type="checkbox"/> ++	<input type="checkbox"/> +	<input type="checkbox"/> +/-	<input type="checkbox"/> -
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<input type="checkbox"/> ++	<input type="checkbox"/> +	<input type="checkbox"/> +/-	<input type="checkbox"/> -
<i>Prevotella intermedia</i>	<input type="checkbox"/> ++	<input type="checkbox"/> +	<input type="checkbox"/> +/-	<input type="checkbox"/> -
<i>Prevotella nigrescens</i>	<input type="checkbox"/> ++	<input type="checkbox"/> +	<input type="checkbox"/> +/-	<input type="checkbox"/> -
<i>Tannerella forsythesis</i>	<input type="checkbox"/> ++	<input type="checkbox"/> +	<input type="checkbox"/> +/-	<input type="checkbox"/> -

Code interne	N° Patient	Visite d'inclusion
21-AOI-05	_ _	

Treponema denticola

++ + +/- -

TRAITEMENTS

- **Traitements concomitants** modifiés (débutés, arrêtés, modification de posologie) depuis la visite de sélection, **en cours et antécédents**

⚡ si Oui, remplir ou mettre à jour la fiche **TRAITEMENTS CONCOMITTANTS**

Note : Le traitement de fond du patient (lié à sa pathologie) est un traitement concomitant à l'essai.

Annexe 3 : Tableau des résultats

	GM16b	GM16p	IJ04a	IJ04p	HF06a	HF06p	WB09a	WB09p	DC17b	DC17p	GM15b	GM15p	BM13b	BM13p	RJ10a	RJ10p	LP08a	LP08p	RE07a	RE07p	DF18b	
Pg	9,62E+03	1,01E+04	2,91E+03	1,09E+05	1,51E+04	1,99E+04	9,94E+03	1,01E+04	5,23E+03	1,34E+02	9,13E+03											
Fa		9,23E+04	1,21E+04	2,66E+05	9,83E+04	3,84E+01	6,54E+04	1,36E+04														
Td		6,36E+04	1,28E+04	1,35E+05	5,26E+04	7,44E+03	8,33E+04	2,55E+03														
Tf	8,22E+03	1,58E+04	6,29E+03	6,66E+04	7,76E+03	1,86E+04	3,37E+03	5,56E+03														
Aa	1,15E+05			1,96E+02		2,56E+02	2,30E+04	2,43E+06														
Cr						4,67E+01		4,67E+01	1,56E+01	1,98E+01												
Dp	2,38E+04	1,50E+04	1,47E+03	1,10E+04	8,22E+04	8,22E+04	3,98E+03	2,91E+04	3,98E+03	3,92E+03												
Ec	2,31E+04	2,89E+03	2,92E+03	2,47E+03	4,05E+04	3,57E+04	3,65E+03	9,06E+03	1,02E+05	2,63E+03	5,02E+03	4,11E+03	1,35E+03									
En	5,24E+03	3,51E+01	9,09E+03	1,71E+03	4,10E+02	3,66E+02	1,77E+03															
Fn	1,52E+05	1,92E+05	1,14E+05	2,30E+05	1,00E+06	2,42E+04	5,41E+04	9,36E+04	2,35E+05	2,81E+03	5,34E+05	8,76E+04	1,83E+04	5,96E+04								
Hp	2,43E+04			2,03E+05	9,34E+04	5,47E+03	8,76E+04	8,76E+04	3,94E+05	8,09E+03	1,15E+05	1,81E+04	1,34E+05									
Kp																						
Mm	6,65E+03	5,36E+03	1,79E+03	1,66E+04	1,66E+04	5,71E+03	6,30E+03	1,08E+03	1,32E+04	2,12E+04	2,53E+04	1,44E+03										
Paerw	4,12E+02	2,03E+02		1,56E+01	1,50E+02	2,95E+02	1,56E+02	1,84E+02	1,84E+02	2,62E+01	1,36E+02	4,96E+02	3,40E+02									
Pana					1,51E+01	1,36E+01																
Pmel	1,59E+07	2,76E+06	5,91E+03	2,32E+05	7,20E+05	6,00E+02	2,63E+03	1,79E+06														
Pmicra	4,63E+04	1,54E+04	1,09E+04	8,85E+04	1,24E+05	3,09E+04	2,75E+04	3,09E+04	2,45E+04	1,43E+04	1,00E+04	7,02E+03	1,00E+04	5,45E+03								
Pd	3,32E+03	3,74E+04	1,80E+04	3,64E+03	7,25E+04	3,28E+03	1,43E+05	4,16E+04	3,02E+03	3,64E+05	6,42E+04	3,02E+03										
Pe	1,36E+07	3,70E+07	1,75E+07	1,56E+07	1,35E+07	7,99E+05	7,99E+05	1,84E+06	3,37E+06	5,46E+06	8,19E+06	7,30E+05										
Pi	3,72E+04	5,68E+04	1,38E+04	2,32E+05	7,20E+05	2,63E+03	6,00E+02	6,24E+02	8,37E+02	1,05E+03												
Pn	7,93E+04	9,44E+05	1,38E+05	1,39E+05	1,24E+06	6,76E+03	4,64E+04	1,47E+03	3,27E+05	1,03E+04	2,14E+05	6,29E+03	2,14E+05	6,38E+02								
Pp	2,36E+06	8,31E+03	1,89E+04	9,94E+04	9,94E+04	7,07E+04	9,94E+04	4,60E+04	4,72E+05	2,18E+04	2,08E+05	2,36E+04	3,60E+04									
Am	3,00E+05	7,59E+04	1,41E+06	3,45E+05	1,24E+06	9,08E+04	1,37E+05	1,13E+04	1,80E+05	3,39E+03	6,58E+05	1,76E+05	1,76E+05	3,06E+05	5,02E+05	1,47E+05	3,67E+05	2,46E+06	1,98E+05	2,46E+06	1,98E+05	3,43E+04
Cg	1,25E+05	3,89E+03	3,69E+05	4,23E+04	3,12E+05	2,29E+06	3,14E+05	4,37E+03	3,89E+04	2,10E+02	1,62E+05	3,71E+04	1,25E+05	4,81E+03								
Ga	1,39E+02	1,02E+03	1,19E+03	1,09E+02	5,19E+03	5,83E+02	1,87E+02	1,84E+02	2,28E+03	3,57E+02	3,86E+03	9,10E+02	3,86E+03	1,30E+02								
Gh						5,79E+04						4,77E+04	3,89E+04	4,77E+04	4,63E+04						8,07E+04	
Ml																	2,48E+02					
Rm	5,02E+05	2,40E+06	1,27E+06	2,28E+05	4,14E+05	2,01E+05	1,01E+06	2,54E+06	2,54E+06	4,41E+05	2,24E+06	2,66E+05	2,24E+06	2,66E+05	2,34E+05	3,73E+05	3,73E+05	7,57E+05	7,57E+05	7,57E+05	4,76E+05	
An	1,52E+06		1,95E+06	6,65E+05	1,37E+06	1,69E+06	8,88E+04	9,96E+05	1,06E+06	2,67E+06	7,64E+05	2,00E+06	7,64E+05	2,00E+06	6,32E+05	1,74E+06	6,51E+06	2,40E+07	2,40E+07	2,40E+07	2,97E+06	
Ssol	1,20E+02	2,26E+02	3,08E+02			3,00E+02	3,00E+02				8,92E+02		8,92E+02		2,43E+02				2,93E+02	2,93E+02	2,93E+02	
Ssmg	1,35E+05		7,69E+04	2,81E+05	5,96E+05	2,50E+06	1,80E+06	1,25E+05	8,29E+05	5,05E+04	5,27E+05	1,10E+04	5,27E+05	1,10E+04	5,77E+04	2,49E+05	1,50E+05	1,33E+06	1,33E+06	1,33E+06	3,49E+05	
Sg	5,18E+07	1,25E+08	7,28E+07	9,07E+07	9,40E+07	7,27E+07	1,18E+08	5,82E+07	1,63E+08	1,79E+07	2,95E+07	1,82E+08	1,78E+08	1,22E+08	1,23E+08	4,00E+07	1,96E+07	5,16E+07	5,16E+07	5,16E+07	8,72E+07	
So	3,78E+03	3,66E+03	1,79E+04	1,44E+03			6,00E+03				1,62E+04	7,37E+04	1,24E+04	7,37E+04	3,11E+02	6,08E+04	1,78E+04	3,90E+05	3,90E+05	3,90E+05	1,62E+05	
Sm		2,25E+03	8,12E+03			5,75E+02	1,94E+01			1,46E+04	7,60E+02	5,55E+03	7,60E+02	5,55E+03	4,01E+03	3,68E+03		5,47E+03	5,47E+03	5,47E+03	2,02E+03	
Cm	1,28E+04	2,40E+04	4,79E+06		4,66E+04			3,55E+04		6,92E+03		7,17E+04	1,30E+05	7,17E+04	1,30E+05	1,53E+04						
Cp	1,92E+03			2,06E+02	2,75E+04			4,97E+03		5,08E+04	2,51E+03	2,94E+03	2,51E+03	2,94E+03	1,95E+02	1,38E+02	1,08E+02	4,56E+03	4,56E+03	4,56E+03	5,83E+03	
S.spuf	3,14E+05	2,93E+05	4,14E+04	3,42E+05	2,67E+06	1,41E+05	2,84E+05	3,76E+04	8,48E+04	2,05E+02	5,15E+04	1,77E+05	5,30E+05	1,77E+05	1,23E+05	3,39E+04	1,78E+06	4,80E+05	1,29E+06	1,29E+06	9,25E+05	
Vp	6,46E+03	5,54E+04	2,10E+05	1,02E+04	3,20E+05	1,32E+06	1,09E+05	2,68E+03	2,81E+05	2,40E+02	1,60E+05	3,37E+04	4,17E+05	4,17E+05	4,14E+05	3,58E+04	5,04E+05	4,54E+04	5,91E+05	5,91E+05	1,80E+05	2,99E+02
HSV1																						
HSV2					1,08E+02																	
VZV			1,25E+02														2,19E+01					
EBV-5																						
CMV																						
HHV6a																						
HHV7			3,43E+03		4,91E+02																	
HHV8	1,82E+04	3,61E+17		5,09E+05	5,70E+04			9,76E+04	9,49E+04		1,29E+03	1,06E+02	1,57E+04	1,06E+02	1,57E+04		6,94E+04		7,57E+02	7,57E+02	1,66E+05	1,04E+02

5 Bibliographie

1. Atri A. The Alzheimer's Disease Clinical Spectrum: Diagnosis and Management. *Med Clin North Am.* 2019;103(2):263-293. doi:10.1016/j.mcna.2018.10.009
2. 2020 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement J Alzheimers Assoc.* Published online March 10, 2020. doi:10.1002/alz.12068
3. Kent SA, Spiers-Jones TL, Durrant CS. The physiological roles of tau and A β : implications for Alzheimer's disease pathology and therapeutics. *Acta Neuropathol (Berl).* 2020;140(4):417-447. doi:10.1007/s00401-020-02196-w
4. A Armstrong R. Risk factors for Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol.* 2019;57(2):87-105. doi:10.5114/fn.2019.85929
5. Han YW, Houcken W, Loos BG, Schenkein HA, Tezal M. Periodontal disease, atherosclerosis, adverse pregnancy outcomes, and head-and-neck cancer. *Adv Dent Res.* 2014;26(1):47-55. doi:10.1177/0022034514528334
6. Pritchard AB, Crean S, Olsen I, Singhrao SK. Periodontitis, Microbiomes and their Role in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci.* 2017;9:336. doi:10.3389/fnagi.2017.00336
7. Olsen I, Singhrao SK. Can oral infection be a risk factor for Alzheimer's disease? *J Oral Microbiol.* 2015;7:29143. doi:10.3402/jom.v7.29143
8. Pascoal TA, Benedet AL, Ashton NJ, et al. Microglial activation and tau propagate jointly across Braak stages. *Nat Med.* 2021;27(9):1592-1599. doi:10.1038/s41591-021-01456-w
9. Itzhaki RF, Lathe R, Balin BJ, et al. Microbes and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis JAD.* 2016;51(4):979-984. doi:10.3233/JAD-160152
10. Interaction between Cytomegalovirus and Herpes Simplex Virus Type 1 Associated with the Risk of Alzheimer's Disease Development - PubMed. Accessed January 24, 2024. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29254081/>
11. Miklossy J, McGeer PL. Common mechanisms involved in Alzheimer's disease and type 2 diabetes: a key role of chronic bacterial infection and inflammation. *Aging.* 2016;8(4):575-588. doi:10.18632/aging.100921
12. Pizzo G, Guiglia R, Lo Russo L, Campisi G. Dentistry and internal medicine: from the focal infection theory to the periodontal medicine concept. *Eur J Intern Med.* 2010;21(6):496-502. doi:10.1016/j.ejim.2010.07.011
13. www.unitheque.com. La parodontologie tout simplement. Unithèque. Accessed March 14, 2024. <https://www.unitheque.com/la-parodontologie-tout-simplement/tout-simplement/espace-id/Livre/343229>
14. Singhrao SK, Harding A. Is Alzheimer's disease a polymicrobial host microbiome dysbiosis? *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2020;18(4):275-277. doi:10.1080/14787210.2020.1729741
15. Dominy SS, Lynch C, Ermini F, et al. *Porphyromonas gingivalis* in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. *Sci Adv.* 2019;5(1):eaau3333. doi:10.1126/sciadv.aau3333
16. Poole S, Singhrao SK, Kesavalu L, Curtis MA, Crean S. Determining the presence of periodontopathic virulence factors in short-term postmortem Alzheimer's disease brain tissue. *J Alzheimers Dis JAD.* 2013;36(4):665-677. doi:10.3233/JAD-121918
17. Tsai MC, Cheng WL, Sheu JJ, et al. Increased risk of dementia following herpes zoster ophthalmicus. Messaoudi I, ed. *PLOS ONE.* 2017;12(11):e0188490. doi:10.1371/journal.pone.0188490

18. Hogestyn JM, Mock DJ, Mayer-Proschel M. Contributions of neurotropic human herpesviruses herpes simplex virus 1 and human herpesvirus 6 to neurodegenerative disease pathology. *Neural Regen Res.* 2018;13(2):211-221. doi:10.4103/1673-5374.226380
19. Singhrao SK, Olsen I. Are Porphyromonas gingivalis Outer Membrane Vesicles Microbullets for Sporadic Alzheimer's Disease Manifestation? *J Alzheimers Dis Rep.* 2018;2(1):219-228. doi:10.3233/ADR-180080
20. DeFina PA, Moser RS, Glenn M, Lichtenstein JD, Fellus J. Alzheimer's Disease Clinical and Research Update for Health Care Practitioners. *J Aging Res.* 2013;2013:1-9. doi:10.1155/2013/207178
21. Vellas B, Robert P. *Traité sur la maladie d'Alzheimer.* Springer Paris; 2013. doi:10.1007/978-2-8178-0443-9
22. Balin BJ, Hudson AP. Etiology and pathogenesis of late-onset Alzheimer's disease. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2014;14(3):417. doi:10.1007/s11882-013-0417-1
23. Dementia. Accessed March 14, 2024. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
24. International AD, Wimo A, Ali GC, et al. World Alzheimer Report 2015: The global impact of dementia: An analysis of prevalence, incidence, cost and trends. Published online September 21, 2015. Accessed March 14, 2024. <https://www.alzint.org/resource/world-alzheimer-report-2015/>
25. Ramarosan H, Helmer C, Barberger-Gateau P, Letenneur L, Dartigues JF, PAQUID. [Prevalence of dementia and Alzheimer's disease among subjects aged 75 years or over: updated results of the PAQUID cohort]. *Rev Neurol (Paris).* 2003;159(4):405-411.
26. International AD, Patterson C. World Alzheimer Report 2018: The state of the art of dementia research: New frontiers. Published online September 21, 2018. Accessed March 14, 2024. <https://www.alzint.org/resource/world-alzheimer-report-2018/>
27. Tonetti MS, Claffey N, European Workshop in Periodontology group C. Advances in the progression of periodontitis and proposal of definitions of a periodontitis case and disease progression for use in risk factor research. Group C consensus report of the 5th European Workshop in Periodontology. *J Clin Periodontol.* 2005;32 Suppl 6:210-213. doi:10.1111/j.1600-051X.2005.00822.x
28. Weller J, Budson A. Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. *F1000Research.* 2018;7:F1000 Faculty Rev-1161. doi:10.12688/f1000research.14506.1
29. APA - DSM - Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. Accessed March 14, 2024. <https://www.appi.org/dsm>
30. ICD-10 Version:2019. Accessed March 14, 2024. <https://icd.who.int/browse10/2019/en>
31. ICD-11 for Mortality and Morbidity Statistics. Accessed March 14, 2024. <https://icd.who.int/dev11/l-m/en>
32. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology.* 1984;34(7):939-944. doi:10.1212/wnl.34.7.939
33. Bahar-Fuchs A, Martyr A, Goh AM, Sabates J, Clare L. Cognitive training for people with mild to moderate dementia. *Cochrane Database Syst Rev.* 2019;3(3):CD013069. doi:10.1002/14651858.CD013069.pub2
34. Weller J, Budson A. Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. *F1000Research.* 2018;7:F1000 Faculty Rev-1161. doi:10.12688/f1000research.14506.1
35. Hudson AP, Balin BJ, Crutcher K, Robinson S. New thinking on the etiology and pathogenesis of late-onset Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis.* 2011;2011:848395. doi:10.4061/2011/848395
36. Gaur S, Agnihotri R. Alzheimer's disease and chronic periodontitis: is there an association? *Geriatr Gerontol Int.* 2015;15(4):391-404. doi:10.1111/ggi.12425

37. Gandy S. The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer disease. *J Clin Invest*. 2005;115(5):1121-1129. doi:10.1172/JCI25100
38. Bartold PM, Narayanan AS. Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues. *Periodontol 2000*. 2006;40(1):29-49. doi:10.1111/j.1600-0757.2005.00140.x
39. Ishikawa I, Nakashima K, Koseki T, et al. Induction of the immune response to periodontopathic bacteria and its role in the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol 2000*. 1997;14(1):79-111. doi:10.1111/j.1600-0757.1997.tb00193.x
40. Wolf HF, Rateitschak EM, Rateitschak KH. *Parodontologie*. Elsevier Masson; 2005.
41. Genco RJ, Borgnakke WS. Risk factors for periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2013;62(1):59-94. doi:10.1111/j.1600-0757.2012.00457.x
42. Janket SJ, Wightman A, Baird AE, Van Dyke TE, Jones JA. Does Periodontal Treatment Improve Glycemic Control in Diabetic Patients? A Meta-analysis of Intervention Studies. *J Dent Res*. 2005;84(12):1154-1159. doi:10.1177/154405910508401212
43. Beck JD, Koch GG, Zambon JJ, Genco RJ, Tudor GE. Evaluation of Oral Bacteria as Risk Indicators for Periodontitis in Older Adults. *J Periodontol*. 1992;63(2):93-99. doi:10.1902/jop.1992.63.2.93
44. Turnbull B. Smoking and periodontal disease. A review. *J N Z Soc Periodontol*. 1995;(79):10-15.
45. Mealey BL, Rose LF. Diabetes mellitus and inflammatory periodontal diseases. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2008;15(2):135-141. doi:10.1097/MED.0b013e3282f824b7
46. Feloutzis A, Lang NP, Tonetti MS, et al. IL-1 gene polymorphism and smoking as risk factors for peri-implant bone loss in a well-maintained population. *Clin Oral Implants Res*. 2003;14(1):10-17. doi:10.1034/j.1600-0501.2003.140102.x
47. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol*. 2018;45(S20). doi:10.1111/jcpe.12935
48. Hajishengallis G, Lamont RJ. Breaking bad: Manipulation of the host response by *Porphyrromonas gingivalis*. *Eur J Immunol*. 2014;44(2):328-338. doi:10.1002/eji.201344202
49. Hajishengallis G, Darveau RP, Curtis MA. The keystone-pathogen hypothesis. *Nat Rev Microbiol*. 2012;10(10):717-725. doi:10.1038/nrmicro2873
50. Aguayo S, Schuh CMAP, Vicente B, Aguayo LG. Association between Alzheimer's Disease and Oral and Gut Microbiota: Are Pore Forming Proteins the Missing Link? De La Torre J, ed. *J Alzheimers Dis*. 2018;65(1):29-46. doi:10.3233/JAD-180319
51. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998;25(2):134-144. doi:10.1111/j.1600-051X.1998.tb02419.x
52. Mosaddad SA, Tahmasebi E, Yazdani A, et al. Oral microbial biofilms: an update. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2019;38(11):2005-2019. doi:10.1007/s10096-019-03641-9
53. Hajishengallis G. Immune evasion strategies of *Porphyromonas gingivalis*. *J Oral Biosci*. 2011;53(3):233-240. doi:10.2330/joralbiosci.53.233
54. LES VIRUS DU GROUPE HERPESVIRIDÆ. Accessed April 23, 2024. <http://www.microbes-edu.org/etudiant/herpes.html>
55. Packard JE, Dembowski JA. HSV-1 DNA Replication-Coordinated Regulation by Viral and Cellular Factors. *Viruses*. 2021;13(10):2015. doi:10.3390/v13102015

56. Slots J, Contreras A. Herpesviruses: a unifying causative factor in periodontitis? *Oral Microbiol Immunol*. 2000;15(5):277-280. doi:10.1034/j.1399-302x.2000.150501.x
57. Abooj J, Varma SA. Prevalence of herpes virus in chronic periodontitis patients with and without type 2 diabetes mellitus: A clinico-microbiological study. *J Oral Maxillofac Pathol JOMFP*. 2021;25(1):141-146. doi:10.4103/jomfp.JOMFP_154_20
58. Contreras A, Slots J. Herpesviruses in human periodontal disease. *J Periodontol Res*. 2000;35(1):3-16. doi:10.1034/j.1600-0765.2000.035001003.x
59. Holmstrup P, Plemons J, Meyle J. Non-plaque-induced gingival diseases. *J Clin Periodontol*. 2018;45(S20). doi:10.1111/jcpe.12938
60. Contreras A, Umeda M, Chen C, Bakker I, Morrison JL, Slots J. Relationship Between Herpesviruses and Adult Periodontitis and Periodontopathic Bacteria. *J Periodontol*. 1999;70(5):478-484. doi:10.1902/jop.1999.70.5.478
61. Maulani C, Auerkari EI, Masulili SLC, Soeroso Y, Santoso WD, Kusdhany LS. Association between Epstein-Barr virus and periodontitis: A meta-analysis. *PLoS ONE*. 2021;16(10 October). doi:10.1371/journal.pone.0258109
62. Steel AJ, Eslick GD. Herpes Viruses Increase the Risk of Alzheimer's Disease: A Meta-Analysis. *J Alzheimers Dis*. 2015;47(2):351-364. doi:10.3233/JAD-140822
63. Chen VCH, Wu SI, Huang KY, et al. Herpes Zoster and Dementia: A Nationwide Population-Based Cohort Study. *J Clin Psychiatry*. 2018;79(1):16m11312. doi:10.4088/JCP.16m11312
64. Bae S, Yun SC, Kim MC, et al. Association of herpes zoster with dementia and effect of antiviral therapy on dementia: a population-based cohort study. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2021;271(5):987-997. doi:10.1007/s00406-020-01157-4
65. Tzeng NS, Chung CH, Lin FH, et al. Anti-herpetic Medications and Reduced Risk of Dementia in Patients with Herpes Simplex Virus Infections—a Nationwide, Population-Based Cohort Study in Taiwan. *Neurotherapeutics*. 2018;15(2):417-429. doi:10.1007/s13311-018-0611-x
66. Scherrer JF, Salas J, Wiemken TL, Hoft DF, Jacobs C, Morley JE. Impact of herpes zoster vaccination on incident dementia: A retrospective study in two patient cohorts. *PloS One*. 2021;16(11):e0257405. doi:10.1371/journal.pone.0257405
67. Lehrer S, Rheinstein PH. Herpes Zoster Vaccination Reduces Risk of Dementia. *Vivo Athens Greece*. 2021;35(6):3271-3275. doi:10.21873/in vivo.12622
68. Itzhaki RF. Overwhelming Evidence for a Major Role for Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV1) in Alzheimer's Disease (AD); Overwhelming Evidence against. *Vaccines*. 2021;9(6):679. doi:10.3390/vaccines9060679
69. Jamieson GA, Maitland NJ, Wilcock GK, Craske J, Itzhaki RF. Latent herpes simplex virus type 1 in normal and Alzheimer's disease brains. *J Med Virol*. 1991;33(4):224-227. doi:10.1002/jmv.1890330403
70. Itzhaki RF, Lin WR, Shang D, Wilcock GK, Faragher B, Jamieson GA. Herpes simplex virus type 1 in brain and risk of Alzheimer's disease. *The Lancet*. 1997;349(9047):241-244. doi:10.1016/S0140-6736(96)10149-5
71. Lin W, Wozniak MA, Cooper RJ, Wilcock GK, Itzhaki RF. Herpesviruses in brain and Alzheimer's disease. *J Pathol*. 2002;197(3):395-402. doi:10.1002/path.1127
72. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *Syst Rev*. 2021;10(1):89. doi:10.1186/s13643-021-01626-4
73. Study Quality Assessment Tools | NHLBI, NIH. Accessed April 23, 2024. <https://www.nhlbi.nih.gov/health-topics/study-quality-assessment-tools>

74. Saygun I, Şahin S, Özdemir A, et al. Detection of Human Viruses in Patients With Chronic Periodontitis and the Relationship Between Viruses and Clinical Parameters. *J Periodontol.* 2002;73(12):1437-1443. doi:10.1902/jop.2002.73.12.1437
75. Saygun I, Kubar A, Şahin S, Şener K, Slots J. Quantitative analysis of association between herpesviruses and bacterial pathogens in periodontitis. *J Periodontal Res.* 2008;43(3):352-359. doi:10.1111/j.1600-0765.2007.01043.x
76. Stein JM, Said Yekta S, Kleines M, et al. Failure to detect an association between aggressive periodontitis and the prevalence of herpesviruses. *J Clin Periodontol.* 2013;40(1):1-7. doi:10.1111/jcpe.12021
77. Moghim SH, Chalabi M, Moghareh Abed A, Rezaei F, Tamizifar H. Prevalence of Epstein-Barr virus type 1 in patients with chronic periodontitis by nested-PCR. *Pak J Biol Sci.* 2007;10(24):4547-4550. doi:10.3923/pjbs.2007.4547.4550
78. Contreras A, Nowzari H, Slots J. Herpesviruses in periodontal pocket and gingival tissue specimens. *Oral Microbiol Immunol.* 2000;15(1):15-18. doi:10.1034/j.1399-302x.2000.150103.x
79. Picolo M, de Araújo Nobre MA, Salvado F, Barroso H. Association of Herpesvirus and Periodontitis: A Clinical and Laboratorial Case-Control Study. *Eur J Dent.* 2023;17(4):1300-1308. doi:10.1055/s-0043-1761423
80. Das S, Krithiga GSP, Gopalakrishnan S. Detection of human herpes viruses in patients with chronic and aggressive periodontitis and relationship between viruses and clinical parameters. *J Oral Maxillofac Pathol JOMFP.* 2012;16(2):203-209. doi:10.4103/0973-029X.98502
81. Dioguardi M, Crincoli V, Laino L, et al. The Role of Periodontitis and Periodontal Bacteria in the Onset and Progression of Alzheimer's Disease: A Systematic Review. *J Clin Med.* 2020;9(2):495. doi:10.3390/jcm9020495
82. Wu CY, Yu ZY, Hsu YC, Hung SL. Enhancing production of herpes simplex virus type 1 in oral epithelial cells by co-infection with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Formos Med Assoc Taiwan Yi Zhi.* 2022;121(9):1841-1849. doi:10.1016/j.jfma.2022.01.023
83. Nakamura M, Shigeishi H, Cheng-Yih SU, Sugiyama M, Ohta K. Oral human cytomegalovirus prevalence and its relationships with periodontitis and *Porphyromonas gingivalis* in Japanese adults: a cross-sectional study. *J Appl Oral Sci Rev FOB.* 2020;28:e20200501. doi:10.1590/1678-7757-2020-00501
84. Chapman JR, Waldenström J. With Reference to Reference Genes: A Systematic Review of Endogenous Controls in Gene Expression Studies. *PLoS One.* 2015;10(11):e0141853. doi:10.1371/journal.pone.0141853
85. Plancoulaine S, Gessain A. Aspects épidémiologiques de l'herpèsvirus humain 8 (HHV-8) et du sarcome de Kaposi. *Médecine Mal Infect.* 2005;35(5):314-321. doi:10.1016/j.medmal.2005.02.009
86. Sahin S, Saygun I, Kubar A, Slots J. Periodontitis lesions are the main source of salivary cytomegalovirus. *Oral Microbiol Immunol.* 2009;24(4):340-342. doi:10.1111/j.1399-302X.2009.00528.x

Serment d'Hippocrate

En présence des Maîtres de cette Faculté, de mes chers condisciples, devant l'effigie d'Hippocrate,

Je promets et je jure, au nom de l'Être Suprême, d'être fidèle aux lois de l'Honneur et de la probité dans l'exercice de La Médecine Dentaire.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail, je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.

Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui se passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon Devoir et mon patient.

Je garderai le respect absolu de la vie humaine dès sa conception.

Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'Humanité.

Respectueux et reconnaissant envers les Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses,

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



Approbation – Improbation

Les opinions émises par les dissertations présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, sans aucune approbation ou improbation de la Faculté de Chirurgie dentaire (1).

Lu et approuvé,

Vu,
Nice, le

Le Président du jury,

Le Doyen de la Faculté de
Chirurgie Dentaire de l'UNS

Professeur

Professeur Laurence LUPI

(1) Les exemplaires destinés à la bibliothèque doivent être obligatoirement signés par le Doyen et par le Président du Jury.

Samy JEBNOUN

IDENTIFICATION DE PATHOGENES PARODONTAUX VIRAUX ASSOCIES A LA MALADIE D'ALZHEIMER

Thèse : Chirurgie Dentaire, Nice, 2023/2024, n°42 57 24 20

Directeur de thèse : Dr LESLIE BORSA

Mots-clés : “Maladie parodontale”, “Parodontite”, “Poche parodontale”, “herpès virus”, “Herpès Simplex virus”, “Epstein Barr virus”, “Cytomegalovirus” et “Maladie d’Alzheimer”.

Résumé :

La maladie d’Alzheimer (MA) affecte presque 50 millions de personnes dans le monde dont 1 million de français. Des preuves toujours plus importantes semblent indiquer un lien entre maladies parodontales et MA, faisant progresser l’hypothèse selon laquelle le microbiote parodontal pourrait jouer un rôle dans la pathogenèse de la maladie. Des études récentes suggèrent que l’inflammation neuronale pourrait avoir une origine infectieuse, or la parodontite est une maladie à composante inflammatoire dont la principale étiologie est infectieuse. Des modifications microbiologiques du biofilm oral (dysbiose) sont responsables de la pathologie. Certains pathogènes parodontaux majeurs ont ainsi été détectés dans les lésions cérébrales de la MA, suggérant une connexion infectieuse entre la sphère oro-pharyngée et le cerveau.

En plus des bactéries parodontopathogènes, de nombreuses études ont suggéré un lien entre parodontite et la présence de virus du groupe des herpès virus humains (HHV). Ainsi, des infections par le virus d’Epstein-Barr (EBV), Herpès simplex type 1 (HSV-1) et le Cytomégalovirus (CMV) ont été reliées à la présence d’une inflammation de la cavité orale et au risque de parodontite.

Nous avons donc réalisé une revue systématique de la littérature à ce sujet qui a permis de conclure à un lien potentiel entre HHV et maladie parodontale. En effet, la grande majorité des études incluses montre une détection significativement plus importante des HHV dans les sites parodontaux atteints vs non atteints, particulièrement concernant HCMV et EBV.

Toutes ces découvertes montrent l’intérêt certain d’améliorer la recherche dans ce domaine. Le deuxième objectif de ce travail de thèse a ainsi été de réaliser sur un nombre réduit d’échantillons de patients atteints et non atteints de MA une détection de pathogènes parodontaux viraux via l’outil *BIOMARK™ HD system*, PCR en système microfluidique de chez Fluidigm. Le protocole de recherche clinique expérimenté dans cette thèse a permis de tester une nouvelle technologie, le système *BIOMARK™ HD*, qui permet de réaliser des milliers de réactions PCR individuelles en simultanée grâce à la technologie microfluidique, sur des échantillons parodontaux, et de mettre en évidence de potentiels axes d’amélioration du protocole de mise en œuvre de cet outil.

A l’issue de ce travail et de l’étude qui en découlera, des données pourraient peut-être mettre en évidence un certain nombre de marqueurs parodontaux prédictifs du développement ou de l’évolution de la MA, avec à la clé un diagnostic précoce et un suivi facilité.